

Effekte onkolytischer Adenoviren auf die Aktivität zellulärer Signaltransduktionswege in Gliomzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Ingenieurin (FH) Denise Treue, geb. Vogler

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Hermann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Hermann
 2. Prof. Dr. Dr. Hermann Lage
 3. Prof. Dr. Carsten Denkert

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2012

Zusammenfassung

Die Therapie des häufigsten primären Hirntumors bei Erwachsenen, des Glioblastoms, gestaltet sich aufgrund der relativen Resistenz gegen Bestrahlung und Zytostatika schwierig und resultiert in einer äußerst schlechten Prognose. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von zellulären Faktoren, die bei einer Behandlung mit dem neuartigen onkolytischen Virus Ad5-Delo3RGD ($\Delta E1A$ -13S, $\Delta E19K$, $\Delta E3$, zusätzliches RGD-Motiv) eine Bedeutung hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie haben. Dazu erfolgte nach der Transduktion von Gliomzellen mit adenoviralen Vektoren, mit unterschiedlichem E1A-Status, eine Analyse der Modulation der globalen Genexpression.

Die *E1A*-Deletante, Ad5-Ad312, war replikationsinkompetent in Gliomzellen und hatte infolgedessen nur einen marginalen Einfluss auf Genebene und keine biologischen Effekte auf Proteinebene.

Das Wildtypvirus (Ad5-wt) mit intakter und das onkolytische Virus (Ad5-Delo3RGD) mit mutierter *E1A*-Region induzierten eine starke Modifikation der zellulären Genexpression in Gliomzellen.

Eine anschließende *in silico*-Analyse zeigte, dass replikationskompetente adenovirale Vektoren (Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD) die Expression spezifischer zellulärer miRNAs induzierten. Einige der regulierten microRNAs wurden bereits mit einer verminderten Expression im malignen Gliom (MIR-124, MIR-128, MIR-181) [1,2,3,4,5,6] bzw. Resistenzen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika (MIR-181) in Zusammenhang gebracht [7,8,9]. Eine viral verstärkte Expression könnte somit Anteil an der antineoplastischen Aktivität der Vektoren haben.

Die Transduktion der Gliomzellen mit Wildtypvirus bzw. onkolytischen Virus resultierte in einer bis zu 60 %-igen Hemmung der Sekretion des Angiogenesefaktors *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Fernerhin konnte in Glioblastomzellen gezeigt werden, dass Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD eine 50 bis 60 %-ige Inhibition der Sekretion von TGF- β 2, sowie eine bis zu 65 %-ige Hemmung der Transkriptionsaktivität des TGF- β -Signalwegs induzierten. Damit reprimieren besagte Viren zelluläre Faktoren, deren Expression im Gliom mit einer schlechten Prognose korreliert ist [10,11,12,13,14,15].

Aufgrund dieser Daten konnte für maligne Gliome ein Modell von Ad5-Delo3RGD-Therapie relevanten zellulären Faktoren entwickelt werden, welches den Zusammenhang zwischen TGF- β 2, VEGF bzw. MIR-181 und der Virotherapie verdeutlicht. Mit Hilfe dieses Modells steigt das Verständnis um die antineoplastische Aktivität des onkolytischen Virus, und ermöglicht damit eine Verbesserung der Ad5-Delo3RGD-basierten Therapie.

Abstract

Glioblastoma is the most common type of brain tumor among adults. The therapy is very difficult, due to its relative resistance to radiation and cytostatics, and often results in fatal prognosis.

The main objective of this thesis was the identification of cellular factors associated with therapy response to adenoviral treatment using the newly developed oncolytic virus Ad5-Delo3RGD. Therefore, after viral transduction of glioma cells with adenoviral vectors, using *E1A*-wildtype and -mutant viruses, an analysis of the modulation of mRNA expression profiles was conducted.

The *E1A* deletion mutant Ad5-Ad312 was replication-deficient in glioma cells and therefore had only marginal influence of host gene transcription level and no biological effect on protein level.

Both, wildtype adenovirus type 5 (Ad5-wt), with intact *E1A*, and oncolytic virus (Ad5-Delo3RGD), with mutated *E1A*, induced strong modifications of gene expression profiles in glioma cells. A subsequent *in silico* analysis indicated a viral induction of specific cellular miRNAs by replication-competent vectors (Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD). Some of the regulated microRNAs have already been linked to a reduced expression (MIR-124, MIR-128, MIR-181) [1,2,3,4,5,6] or resistance (MIR-181) [7,8,9] within malign gliomas. A reinforced viral expression could be part of the antineoplastic activity of the vectors.

The transduction of glioma cells with wildtype or oncolytic virus resulted in a 60 % reduced secretion of the angiogenesis factor *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). In addition it was shown that Ad5-wt and Ad5-Delo3RGD induced a reduced secretion of TGF- β 2 by 50 to 60 % and a repression of the SMAD2/SMAD3/SMAD4-specific transcription activity up to 65 %. Thus the viruses inhibit cellular factors, which expression is correlated to a weak prognosis [10,11,12,13,14,15].

Based on this data a new model for malign glioma was developed, which illustrates the relationship between virotherapy and the cellular factors TGF- β 2, VEGF and MIR-181, which are associated with treatment response to Ad5-Delo3RGD-based therapy. The model helps to understand the basic antineoplastic activity of the oncolytic virus and therefore should help to improve Ad5-Delo3RGD-based therapy.

*Es kommt nicht darauf an die Welt zu verändern,
sondern sie zu vermenschlichen.*

- Karl Steinbuch

Meinen geliebten Töchtern.

Meinem Mann Constantin.

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT	II
INHALTSVERZEICHNIS	V
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 TUMORE DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS	1
1.1.1 Ätiologie und Klassifikation primärer Hirntumore.....	1
1.1.2 Gliome	1
1.1.3 Klassifikation astrozytärer Gliome.....	2
1.1.4 Gliomgenese von Astrozytomen	3
1.1.5 Therapie	4
1.2 SOMATISCHE GENTHERAPIE.....	5
1.2.1 Adenovirale Tumorthherapie.....	7
1.2.1.1 Adenoviren	7
1.2.1.2 Adenoviraler Replikations-/Infektionszyklus.....	7
1.2.1.3 Konditional replizierende onkolytische Adenoviren	10
1.2.1.1 Onkolytisches Adenovirus Ad5-Delo3RG und andere verwendete Adenoviren	12
1.3 Y-BOX-PROTEIN 1 (YB-1)	14
1.3.1 Lokalisation	15
1.3.2 Funktion.....	15
1.3.3 Virale Wechselwirkungen	16
1.4 ZIEL DER ARBEIT	18
2 MATERIAL	19
2.1 BIOLOGISCHES MATERIAL.....	19
2.2 ZELLINIEN	19
2.3 VIREN	20
2.4 CHEMIKALIEN	20
2.5 ANTIKÖRPER.....	22
2.1 KITS.....	22
2.2 ENZYME	23

2.3	ZYTOKINE.....	23
2.1	RADIONUKLEOTID.....	23
2.2	NUKLEINSÄUREN	24
2.3	GERÄTE	24
2.4	SOFTWARE.....	25
2.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
3	METHODEN	27
3.1	ZELLEN UND ZELLKULTUR	27
3.1.1	<i>Kultivierung humaner Zelllinien.....</i>	<i>27</i>
3.1.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	<i>27</i>
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	27
3.2.1	<i>Isolierung von genomischer DNA</i>	<i>27</i>
3.2.2	<i>Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....</i>	<i>28</i>
3.2.3	<i>Restriktionsverdau von DNA.....</i>	<i>28</i>
3.2.4	<i>Southern Blot-Analyse</i>	<i>28</i>
3.2.5	<i>Isolation zellulärer RNA</i>	<i>29</i>
3.2.6	<i>Reverse Transkription</i>	<i>30</i>
3.2.7	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	<i>30</i>
3.2.8	<i>Real-time RT-PCR im LightCycler™.....</i>	<i>31</i>
3.2.9	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	<i>35</i>
3.2.10	<i>Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	<i>35</i>
3.2.11	<i>Microarray-Analyse.....</i>	<i>36</i>
3.2.12	<i>Isolierung von Gesamtprotein</i>	<i>38</i>
3.2.13	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration.....</i>	<i>38</i>
3.2.14	<i>Western Blot-Analyse</i>	<i>39</i>
3.2.15	<i>Sekretionsassay mittels ELISA-Technik</i>	<i>41</i>
3.2.16	<i>Reporter-Assay</i>	<i>42</i>
3.3	ADENOVIRALE METHODEN.....	43
3.3.1	<i>Herstellung aufgereinigter hochkonzentrierter Virusstammlösungen.....</i>	<i>43</i>
3.3.2	<i>Bestimmung des Virustiter</i>	<i>44</i>
3.3.3	<i>Adenovirale Transduktion von Gliomzellen</i>	<i>44</i>
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	45
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	ÜBERPRÜFUNG DER VIREN UND IHRER REPLIKATIONSKOMPETENZ BZW. -INKOMPETENZ	46
4.1.1	<i>Überprüfung des viralen E1-Status durch PCR</i>	<i>46</i>
4.1.2	<i>Darstellung der Adenovirus DNA-Replikation.....</i>	<i>47</i>

4.2	MICROARRAY-ANALYSE.....	48
4.2.1	Globale Expressionsanalysen von adenoviral transduzierten Gliomzellen	48
4.2.2	KEGG-Signalweg bezogene Auswertung der Microarray-Ergebnisse	52
4.2.2.1	E2F-Targetgene	53
4.2.2.2	Apoptose	54
4.2.2.3	Wnt-Signalweg	56
4.2.2.4	TGF- β -Signalweg	57
4.2.3	Identifikation differenziell regulierter miRNA mittels 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse	58
4.3	VALIDIERUNG DER DIFFERENZIELLEN EXPRESSIONSDATEN DES MICROARRAYS MITTELS REAL-TIME RT-PCR	61
4.3.1	E2F-Targetgene.....	61
4.3.2	Apoptose-assoziierte Gene	62
4.3.3	Wnt-Signalweg	64
4.3.4	TGF- β -Signalweg	65
4.4	VALIDIERUNG DER MICROARRAY-ERGEBNISSE AUF PROTEIN-EBENE.....	66
4.4.1	Western Blot-Analyse	67
4.4.1.1	Wnt-Signalweg	67
4.4.1.2	TGF- β -Signalweg	68
4.4.2	Sekretionsassay	69
4.4.2.1	Angiogenesefaktor VEGF	69
4.4.2.2	TGF- β -Signalweg	71
4.5	MESSUNG DER TRANSKRIPTIONSAKTIVITÄT DES TGF- β -SIGNALWEGS NACH ADENOVIRALER TRANSDUKTION MITTELS REPORTERASSAYS	73
5	DISKUSSION	76
5.1	GENERELLE EFFEKTE ADENOVIRALER VEKTOREN AUF ZELLULÄRE SIGNALWEGE	76
5.1.1	Bewertung der grundlegenden Eigenschaften der verwendeten Adenoviren	76
5.1.2	Einfluss der adenoviralen Vektoren auf allgemeine zelluläre Signalwege.....	78
5.1.2.1	E2F-Targetgene	80
5.1.2.2	Apoptose-assoziierte Gene	81
5.2	EINFLUSSNAHME AUF DIE EXPRESSION POTENTIELLER TARGETGENE VON MI RNAS	82
5.2.1.1	Zelluläre miRNAs und deren Regulation durch Adenoviren.....	83
5.2.1.2	Regulation zellulärer miRNAs, die in Zusammenhang mit humanen Tumoren stehen	84
5.3	EINFLUSS AUF DEN WNT-SIGNALWEG UND HEMMUNG DES ANGIOGENESEFAKTORS VEGF	85
5.3.1.1	Virale Regulationen des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF).....	86
5.3.1.2	Virale anti-Angiogenese-Therapie und weitere therapeutische Anwendungen	87
5.4	INHIBITION DES TGF- β -SIGNALWEGS	88
5.4.1.1	E1A induziert Hemmung des TGF- β -Signalwegs in Glioblastomzellen.....	88
5.4.1.2	Selektive Hemmung von TGF- β 2 im Gliom	90
5.4.1.3	Der TGF- β Signalweg und Wechselwirkungen mit VEGF.....	90

5.4.1.4	Potentieller Mechanismus der Hemmung des TGF- β -Signalwegs	91
5.5	MODELL VON Ad5-DELO3RGD-THERAPIE RELEVANTEN ZELLULÄREN FAKTOREN IM GLIOM	92
5.5.1	<i>Adenovirale Regulationen der Therapie-relevanten Faktoren vermittelt durch Ad5-Delo3RGD in Gliomzellen</i>	94
6	AUSBLICK	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	97
8	ANHANG	122
9	GLOSSAR	133
	DANKSAGUNG	137
	LEBENS LAUF	138
	PUBLIKATIONEN	139
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentuale Verteilung der Astrozytome und deren Subtypen an den primären Hirntumoren neuroepithelialen Gewebes [30]	2
Abb. 2: Indikationen der durchgeführten Gentherapiestudien und der prozentuale Anteil der genutzten Vektorsysteme in der Krebstherapie [68]	5
Abb. 3: Frühe Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms und ihre Funktionen	9
Abb. 4: Schematische Darstellungen der Genome von Ad5-wt, Ad5-312 und Ad5-Delo3RGD.	13
Abb. 5: Schematische Darstellung der Genregulation der <i>E2</i> -Region [265]	16
Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstrukte des Cignal™ Reporter Assays [289]	42
Abb. 7: Nachweis der <i>E1A</i> -Deletion von Ad5-312, bzw. der <i>E1A-13S</i> -Deletion von Ad5-Delo3RGD im Vergleich zum Ad5-wt	46
Abb. 8: Adenovirale DNA-Replikation von Ad5-wt, sowie Ad5-Delo3RGD, jedoch nicht von der <i>E1A</i> -Deletante Ad5-312, in Glioblastomzelllinien	47
Abb. 9: Genexpression-Verzeichnisbaum für alle Sonden des <i>Microarrays</i> HG-U133 A 2.0.	49
Abb. 10: Schnittmengendiagramme zum gemeinsamen Einfluss adenoviraler Vektoren aufgeschlüsselt nach Zelllinien.	51
Abb. 11: Ausschnitt der Regulationen des kanonischen Wnt-Signalwegs in Gliomzellen durch die Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD	56
Abb. 12: Ausschnitt der Regulationen des TGF- β -Signalwegs in Gliomzellen durch die Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD	58
Abb. 13: Die adenovirale Transduktion hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Signalmoleküls β -Catenin.	67
Abb. 14: Inhibition der SMAD3-Proteinexpression nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt.	68
Abb. 15: Inhibition der Sekretion des Angiogenesefaktors VEGF in Gliomzelllinien nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt	70
Abb. 16: Inhibition der Sekretion von TGF- β 2, nicht aber TGF- β 1, in Gliomzelllinien nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt	72
Abb. 17: Inhibition der Aktivität von SMAD2/SMAD3/SMAD4-Reporterkonstrukten nach viraler Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD bei gleichzeitiger Stimulation durch TGF- β 2.	74
Abb. 18: Potentieller Mechanismus der Hemmung des TGF- β -Signalwegs und der Hypoxie-unabhängigen Inhibition von VEGF durch E1A in Glioblastomzellen	92
Abb. 19: Modell zur Darstellung von Ad5-Delo3RGD-Therapie relevanten zellulären Faktoren im Gliom	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung: Intrakranielle Tumore der astrozytären Reihe (modifiziert nach [39])	3
Tab. 2: Verwendete humane Zelllinien	19
Tab. 3: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide, alphabetisch geordnet	31
Tab. 4: Sequenzen der für die <i>real-time</i> RT-PCR verwendeten Oligonukleotide, alphabetisch geordnet	34
Tab. 5: Auflistung der für den Western Blot eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper	40
Tab. 6: Schnittmengeberechnungen zum Einfluss adenoviraler Vektoren auf gemeinsame zelluläre Faktoren der Gliomzelllinien LN-18, U-373MG und U-87MG	50
Tab. 7: Signifikant regulierte Signaltransduktionswege, geordnet nach Anzahl differenziell exprimierter Gene	53
Tab. 8: Regulation der E2F-Targetgene durch Ad5-Ad312, Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen	54
Tab. 9: Regulation von Apoptose-assoziierten Genen durch Ad5-Ad312, Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen	55
Tab. 10: 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse von downregulierten Targetgenen durch Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen	59
Tab. 11: Überprüfung der <i>Microarray</i> -Daten von E2F-Targetgenen anhand einer Auswahl an Faktoren mittels <i>real-time</i> RT-PCR, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	62
Tab. 12: Überprüfung der <i>Microarray</i> -Daten von Apoptose-assoziierten Genen anhand einer Auswahl an Faktoren mittels <i>real-time</i> RT-PCR, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	63
Tab. 13: Überprüfung der <i>Microarray</i> -Daten des Wnt-Signalwegs anhand einer Auswahl an Genen mittels <i>real-time</i> RT-PCR, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	64
Tab. 14: Überprüfung der <i>Microarray</i> -Daten des TGF- β -Signalwegs anhand einer Auswahl an Genen mittels <i>real-time</i> RT-PCR, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	66
Tab. 15: <i>Microarray</i> -Analyse differenziell exprimierter E2F-Targetgene in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	122
Tab. 16: <i>Microarray</i> -Analyse differenziell exprimierter Apoptose-assoziierten Gene in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	124
Tab. 17: <i>Microarray</i> -Analyse differenziell exprimierter Gene des Wnt-Signalweg in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	126
Tab. 18: <i>Microarray</i> -Analyse differenziell exprimierter Gene des TGF- β -Signalweg in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die <i>Fold Change</i> -Werte	128
Tab. 19: 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse von differenziell regulierten Genen durch Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen	130

1 Einleitung

1.1 Tumore des zentralen Nervensystems

Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) werden, je nach Ursprung der Neoplasie als primär oder sekundär charakterisiert. Sekundäre Hirntumore stellen Metastasen extrakranieller Tumore dar, wohingegen primäre intrakranielle Tumore, ursprünglich innerhalb des Schädels entstehen.

Primäre und sekundäre Tumore des ZNS machen lediglich 2 % aller menschlichen Tumore aus, dennoch spielen sie klinisch gesehen eine wichtige Rolle [16,17]. Da das Volumen des intrakraniellen Raumes durch knöcherne Strukturen, den Schädel, begrenzt ist, führt jeder progrediente raumfordernde Prozess zu einer Abfolge von Ereignissen, die unbehandelt zum Tode führen [18,19,20].

Die Diagnose erfolgt vielfach im Erwachsenenalter nach erstmalig auftretenden epileptischen Anfällen [21]. Als häufigstes Krankheitszeichen tritt der sogenannte Hirntumortrias auf, zu dem Kopfschmerz, Erbrechen oder Übelkeit und Stauungspapillen zählen, aber auch Schwindel und Wesensänderungen sind möglich [20,22].

1.1.1 Ätiologie und Klassifikation primärer Hirntumore

Die Ätiologie primärer Hirntumore ist noch weitestgehend unklar. Mit Ausnahme einiger seltener Erbkrankheiten [23], wie dem Li-Fraumeni-Syndrom [24], und ionisierender Strahlung zu therapeutischen Zwecken bei Kindern [25] sind bislang noch keine spezifischen Noxen oder Umweltbedingungen identifiziert worden. Männer sind etwas stärker betroffen, als Frauen. Zudem scheint die ethnische Herkunft eine Rolle zu spielen, so haben Afroamerikaner eine geringere Wahrscheinlichkeit an primären Hirntumoren zu erkranken als kaukasische [26,27].

1.1.2 Gliome

Gliome, die etwa 90 % aller primären Hirntumore ausmachen, wurden erstmalig 1864-65 von Rudolf Virchow als „Geschwülste der interstitiellen Substanz“ [28] beschrieben.

Diese hirneigenen Tumore entwickeln sich aus Gliazellen bzw. deren Vorläufern und können histologisch sowie immunhistochemisch als astrozytäre Tumore (Astrozytom, Glioblastom), oligodendrogliale Tumore (Oligodendrogliom, anaplastisches Oligodendrogliom) und ependymale Tumore eingeordnet werden. Eine weltweit anerkannte Klassifikation der Malignität auf Basis histopathologischer, molekularpathologischer und klinischer Befunde erfolgt nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation: WHO*) [29].

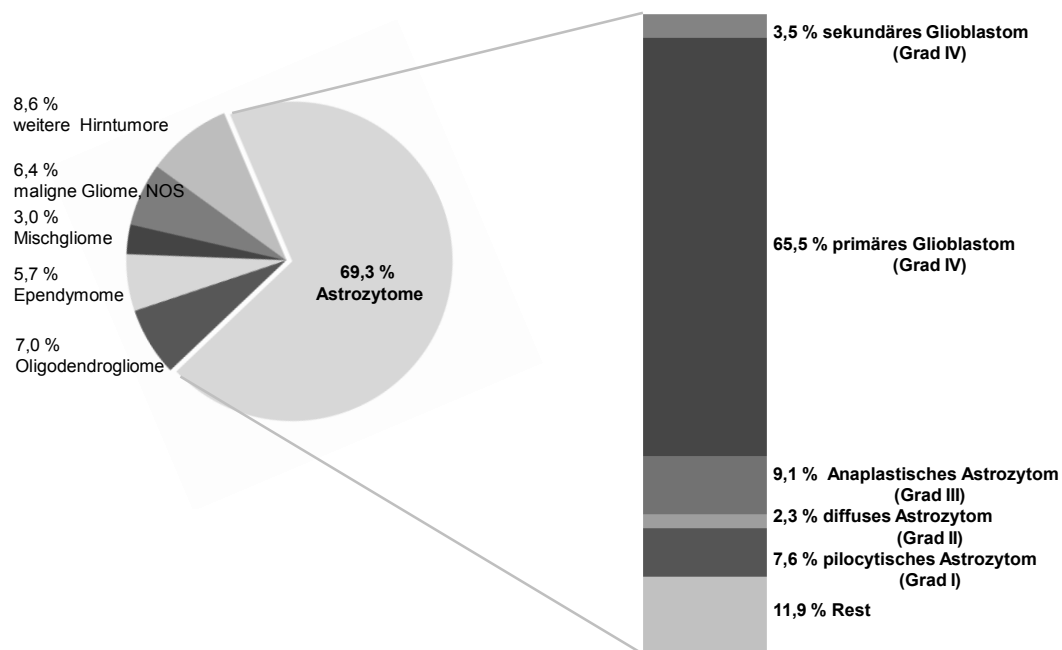


Abb. 1: Prozentuale Verteilung der Astrozytome und deren Subtypen an den primären Hirntumoren neuroepithelialen Gewebes [30]

NOS: *not otherwise specified* - nicht weiter beschrieben; Rest: *Unique Astrocytoma Variants, Astrocytoma NOS*

1.1.3 Klassifikation astrozytärer Gliome

Astrozytäre Gliome bilden eine biologisch und histologisch heterogene Gruppe, je nach Tumorentität kann sich das Erkrankungsalter, Wachstums- bzw. Invasionspotential unterscheiden. Im Wesentlichen werden jedoch zwei Gruppen differenziert. Das pilozytische Astrozytom (WHO-Grad I) und die diffus infiltrierenden Astrozytome (WHO-Grad II - IV).

Diffuse Astrozytome (WHO-Grad II) manifestieren sich gewöhnlich im Erwachsenenalter und bilden ausnahmslos Rezidive, die häufig assoziiert sind mit einer Progression zum anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) und zum sekundärem Glioblastom (WHO-Grad IV) [16,31,32]. Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme, GBM) ist der häufigste und bösartigste Tumor des ZNS mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 12 Monaten, trotz therapeutischer Intervention. Sekundäre Glioblastome sind selten und entwickeln sich bei Patienten im Alter von etwa ab 45 Jahren (Tab. 1). Dagegen bilden mit etwa 65 % die primären Glioblastome die größte Gruppe unter den astrozytären Tumoren. Sie entstehen bei älteren Patienten *de novo* ohne Hinweise auf frühere Symptomatik oder vorausgegangene niedriggradige Tumore [16]. Scherer hat 1940 zum ersten Mal die Bezeichnungen primäre und sekundäre Glioblastome eingeführt [33], welche histopathologisch keine Unterschiede zeigen, aber aufgrund ihrer ungleichen Entstehungsgeschichte verschiedene genetische Aberrationen aufweisen können [32,34,35,36], was die Möglichkeit erhöht, dass die Tumore unterschiedlich auf Therapien reagieren könnten [37]. Allgemein beschrieb die frühere Bezeichnung Glioblastome multiforme, das histomorphologisch „bunte“ Bild [38].

Tab. 1: Zusammenfassung: Intrakranielle Tumore der astrozytären Reihe (modifiziert nach [39])

Gruppe	Tumor	WHO-Grad	Dignität	Medianes Alter	5-Jahres-Überleben/ medianes Überleben**	Inzidenz-Rate ***	M/F ****	Histopatholog. Kriterien
Seperate Erkrankung	Pilocytisches Astrozytom	I	benigne	10-13 Jahre	87 %	0,27	1,0	Diff. hoch A möglich D gering M gering E möglich N möglich
diffus-infiltrierende Astrozytome	Diffuses/niedriggradiges Astrozytom	II	semi-benigne	47 Jahre [40]	49 % (6-8 Jahre) [41]	0,1	1,2	Diff. mäßig A gering D gering M gering E fehlt N fehlt
	Anaplastisches Astrozytom	III	maligne	50 Jahre [40]	31 % (2-3 Jahre) [42]	0,48	1,4	Diff. variabel A verstärkt D erhöht M erhöht E fehlt N fehlt
	Sekundäres Glioblastom → <i>Tumorprogression</i>	IV	hoch maligne	45 Jahre [43]	3 %	2,6	1,6	Diff. gering A ausgeprägt D erhöht
	Primäres Glioblastom → „de novo“	IV	hoch maligne	62 Jahre [49]	(9-12 Monate) [44,45,46,47,48]			M erhöht E ausgeprägt N vorhanden

(**) definiert als Wahrscheinlichkeit, >5 Jahre zu überleben, im Vergleich mit einer Referenzpopulation gleichen Alters; (***) Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr; (****) Geschlechterverhältnis Männer/Frauen (Diff.) Differenzierung, (A) Zelltypen, (D) Zelldichte, (M) Mitoserate, (E) Endothelproliferation, (N) Nekrose

1.1.4 Gliomgenese von Astrozytomen

Kein Gliom eines bestimmten WHO-Grades basiert auf einer spezifischen genetischen Veränderung bzw. Mutation. Die Gliomgenese vom Astrozyten bzw. astrozytären Vorläuferzellen zu Tumorzellen unterliegt einer Kaskade vieler zellulärer und molekularer Veränderungen. Die Anzahl der genetischen und chromosomalen Veränderungen nimmt vom diffusen Astrozytom (Grad II) zum Glioblastom (Grad IV) signifikant zu. Dabei repräsentieren morphologische Veränderungen während der malignen Progression die der Reihe nach erworbenen genetischen Alterationen [50]. Auswertung von Studien belegen, dass hauptsächlich nicht-molekulargenetische Faktoren einen Einfluss auf das Überleben haben. Zu diesen Faktoren gehören, neben dem Grad der Dignität, das Patientenalter, die Histologie, der Karnofsky-Performance-Status zum Zeitpunkt der Diagnose, das Tumervolumen und -lokalisation, das operative Resektionsmaß sowie die postoperative adjuvante Therapie [51,52,53].

1.1.5 Therapie

Ohne Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit von Patienten lediglich 3-4 Monate [54]. Die Standardtherapie von anaplastischen Astrozytomen bzw. Glioblastomen besteht aus der Resektion oder Biopsie, gefolgt von der Strahlentherapie und der begleitenden Chemotherapie [55].

Operation

Aufgrund der Fähigkeit des infiltrativen Wachstums von Astrozytomen ist eine vollständige Resektion und damit Heilung nicht möglich [56]. In 90 % der Fälle werden Rezidive in unmittelbarer Nachbarschaft des Primärtumors beobachtet [54,57,58,59]. Bei den operativen Maßnahmen stehen sich die Biopsie und die chirurgische Resektion kontrovers gegenüber. So führt eine chirurgische Resektion zum sofortigen Erfolg bei der Kontrolle von Symptomen, die durch raumfordernde Prozesse hervorgerufen werden. Außerdem wird Gewebe für die histologische Diagnose bereitgestellt. Es gibt überzeugende Daten, dass eine extensive Tumoresektion von über 98 % des Volumens einen Einfluß auf das Überleben hat [53]. Dennoch steht die weitgehende Reduktion des Tumorumfanges bei bestmöglichem neurologischem Funktionserhalt im Vordergrund.

Bestrahlung

Routinemässig folgt nach Resektion oder Biopsie anaplastischer Astrozytome und Glioblastome die postoperative Bestrahlung. Die Strahlentherapie in Dosierungen von 60 Gy, bestehend aus 1,8-2 Gy-Fraktionen, entspricht dem Standard [60]. Einige Studien demonstrierten die Wichtigkeit einer Bestrahlung nach erfolgter Resektion [61]. Generell werden maligne Gliomzellen allerdings als nur mäßig strahlensensibel angesehen [62].

Chemotherapie

Die Chemotherapie zählt zu den adjuvanten, also unterstützenden Therapiemaßnahmen. Aufgrund der geringen Chemosensitivität und der eingeschränkten Erreichbarkeit des Tumors, bedingt durch die Blut-Hirn-Schranke, hatte diese Therapie einen geringeren Stellenwert. Durch die Entwicklung von Temozolomid (TMZ), einem alkylierenden Chemotherapeutikum, ist in diesem Bereich erneutes Interesse aufgekommen. Temozolomid, ein oral verabreichtes Medikament, zeigt aufgrund seiner hoch lipophilen Eigenschaften eine gute Penetranz der Blut-Hirn-Schranke, mit Erreichen von therapeutischen Konzentrationen im ZNS bei gleichzeitig günstigem Toxizitätsprofil [63]. TMZ entfaltet seine toxische Wirkung durch die Methylierung von DNA an unterschiedlichen Stellen. Dabei korreliert die Ansprechbarkeit der Tumore auf die TMZ-Therapie mit dem Methylierungsstatus des Methylguanin-Methyltransferase-(MGMT)-Promotors. Ist der Promotor methyliert, hat das DNA-Reparaturenzym MGMT eine geringere oder fehlende Aktivität und kann die durch alkylierende Substanzen verursachte Schäden an der DNA nicht reparieren. Folglich scheinen die Tumorzellen besser auf eine TMZ-

Therapie anzusprechen [64]. Die konkomitante und adjuvante Chemotherapie mit TMZ (6 Zyklen) gilt als neuer Standard [55].

Experimentelle Therapien

Das Glioblastom ist die häufigste Tumorentität unter den Gliomen. Aufgrund seiner biologischen Eigenschaften, wie infiltratives Wachstum, begrenzte Chemo- und Radiosensitivität oder der inhärenten Tendenz zur malignen Progression, ist die Prognose sehr schlecht. Trotz Weiterentwicklungen konventioneller Therapien, beträgt das mediane Überleben der Patienten etwa ein Jahr [17,65,66]. Eine Heilung ist bislang unmöglich. Durch neue Erkenntnissen über die molekulargenetische Grundlagen der Gliome stellt die Gentherapie eine vielversprechende Behandlungsalternative dar.

1.2 Somatische Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man die Einführung genetischen Materials in die somatischen Zellen eines Organismus mit dem Ziel der Heilung oder therapeutischen Besserung. Bei der somatischen Gentherapie werden grundsätzlich drei verschiedene Formen des Gentransfers unterschieden [67]. In der *ex vivo*-Therapie erfolgt die Behandlung der Zellen außerhalb des Organismus, weshalb sie anschließend wieder reimplantiert werden müssen. Bei der *in situ*-Therapie wird der therapeutische Vektor direkt in das Zielgewebe injiziert und in der *in vivo*-Therapie wird dem Organismus das Therapeutikum peripher appliziert.

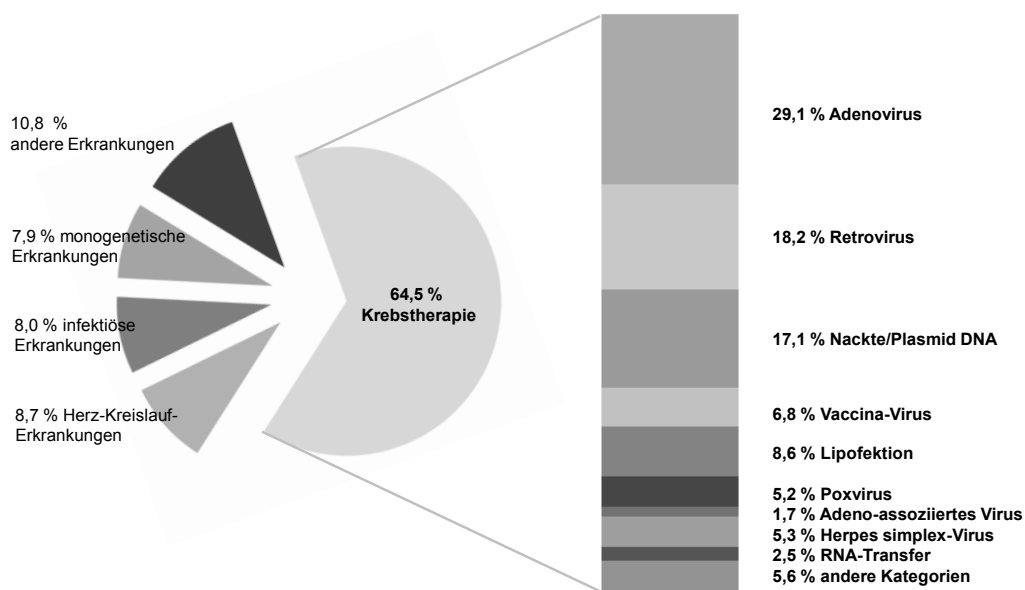


Abb. 2: Indikationen der durchgeführten Gentherapiestudien und der prozentuale Anteil der genutzten Vektorsysteme in der Krebstherapie [68]

Im Fokus der Anwendungen standen bislang zunächst monokausale genetische Defekte, wie SCID (*severe combined immunodeficiency*; schwerer kombinierter Immundefekt), deren Behandlung die momentan noch eher seltenen Erfolge in der Gentherapie ausmachen [69,70]. Gegenwärtig konzentriert sich die Mehrzahl der gentherapeutischen Anwendungen auf erworbene Krankheiten, wie kardiovaskuläre, Infektions- und v.a. Krebserkrankungen (Abb. 2). Der derzeit limitierende Schritt in gentherapeutischen Anwendungen ist der effiziente Transport des therapeutischen Genmaterials in die Zielzelle, weshalb der Einsatz oft nur mit wenig Erfolg verbunden ist [71].

Vektoren

Vektoren sind Vehikel, die für den Transfer der therapeutischen Nukleinsäuren verwendet werden. Dabei ist für den Erfolg einer Therapie die Wahl des Vektors entscheidend, welche wiederum von der therapeutischen Anwendung abhängt. Grundsätzlich hat der ideale Vektor eine hohe Effizienz und hohe Selektivität beim Gentransfer in die Zielzellen. Er besitzt eine ausreichend hohe Aufnahmekapazität für Transgene und gewährleistet eine lange Genexpression. Gleichzeitig wird der Vektor nicht vom Immunsystem erkannt und neutralisiert, zudem verursacht er keine toxischen oder anderweitig pathogenen Nebenwirkungen [72].

Grundsätzlich werden hierbei zwei Vektorsysteme unterschieden, die viralen und nicht-viralen Vektoren. Zu Letzteren zählt man beispielsweise Liposomen. Generell sind diese Vehikel nicht immunogen oder pathogen und können kostengünstig in hoher Reinheit produziert werden. Aufgrund ihrer geringen Transfektionseffizienz sind nicht-virale Vektoren jedoch nicht für *in vivo*-Anwendungen geeignet.

Virale Vektorsysteme sind die am häufigsten (70 %) verwendeten Vektoren in der Gentherapie [68,73]. Viren sind intrazelluläre Parasiten, die in der Lage sind mit hoher Spezifität eine Zielzelle zu infizieren, um dort die eingeschleuste virale Erbinformation exprimieren zu lassen. In der gentherapeutischen Anwendung bedient man sich dieser natürlichen Eigenschaften der Viren. Dabei kommen hauptsächlich Adenoviren und Retroviren zum Einsatz. Retroviren haben den Vorteil, dass eine stabile Expression des Transgens ermöglicht wird, weil sich die virale DNA in das Wirtsgenom integriert. Das Insertions-Ereignis kann aber gleichzeitig zu schwerwiegenden Mutationen (Insertionsmutagenese) führen, die wiederum die Tumorentstehung begünstigen [74,75,76]. Außerdem können Retroviren ausschließlich nicht-proliferierende Zellen infizieren, dabei bildet die Gattung der Lentiviren jedoch eine Ausnahme [77]. Adenoviren hingegen sind in der Lage zahlreiche Zellen zu transduzieren, auch ruhende, und ermöglichen eine effiziente Genübertragung. Bei ihnen besteht nicht die Gefahr einer Insertionsmutagenese, da Adenoviren ihr Genom nicht ins Wirtsgenom integrieren. Dieser Umstand bedingt jedoch eine transiente Expression von Transgenen.

1.2.1 Adenovirale Tumorthherapie

Adenoviren sind effizient in der Transduktion von Zielzellen und gut geeignet für den Transport therapeutischer Nukleinsäuren. Sie können in hohen Titern (Konzentrationen) hergestellt werden und sind fähig Transgene als Insertionen zu tragen. Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften werden sie in 24 % aller Gentherapie-Studien und sogar in 29 % der gentherapeutischen Anwendungen zur Krebstherapie genutzt ([68], Abb. 2). Die dabei am häufigsten verwendeten adenoviralen Serotypen sind Typ 2 (Ad2) und der in dieser Arbeit verwendete Typ 5 (Ad5), da beide ein komplett charakterisiertes Genom besitzen [78], welches relativ einfach Manipulation erlaubt [79]. Ad5 dient als Plattform für eine Vielzahl von onkolytisch viralen Agenzien [80]. Der Vorteil dieser Vektoren ist das sie in Tumorzellen replizieren und daher am Ende jedes viralen reproduktiven Zyklus die Zellzerstörung und Freisetzung neuer viraler Partikel steht [81].

1.2.1.1 Adenoviren

Humane Adenoviren wurden erstmals 1953 von W.P. Rowe aus dem adenoidem Gewebe und Tonsillen isoliert [82], allgemeine Bekanntheit erreichten sie jedoch erst 1977 durch die Entdeckung des RNA-Spleißens [83,84]. Sie gehören zur Familie der Adenoviridae mit dem Genus Mastadenoviren. Diese Gattung beinhaltet ausschließlich Viren, die in Säugern vorkommen. Die humanen Adenoviren werden in 6 Subgruppen (A-F) gegliedert, den Subgruppen werden 49 Serotypen zugeteilt [78,85,86,87,88]. Das innerhalb dieser Arbeit verwendete Adenovirus Typ 5 gehört zur Subgruppe C, besitzt kein onkogenes Potential [89] und verursacht meist nur milde Erkältungserkrankungen [78,90].

Ad5 ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, dessen unbehülltes Kapsid eine ikosaedrische Struktur aufweist [79,91,92]. Das Kapsid besteht aus zwei Arten von Kapsomeren: den Hexonen und Pentonen. Die 20 Seitenflächen des Viruspartikels werden von je 12 Hexonen gebildet, die 12 Ecken bestehen aus jeweils einer Pentonbasis. Jede Pentonbasis ist mit einem Fiberprotein assoziiert, welches antennenartig hervorragt und durch eine knopfförmige Struktur (Knob-Domäne) abgeschlossen wird.

Das Genom von Ad5 besteht aus einer ca. 35.935 bp-langen linearen doppelsträngigen DNA, die an beiden 5'-Enden kovalent an ein terminales Protein (TP) gebunden ist und zusammen mit den Core-Proteinen den Nukleoproteinkomplex bildet [93]. Beide DNA-Stränge kodieren für Proteine, wobei die offenen Leserahmen in beide Richtungen des Genoms weisen (Abb. 4 in Kapitel 1.2.1.1).

1.2.1.2 Adenoviraler Replikations-/Infektionszyklus

Der adenovirale Infektionszyklus ist in zwei Phasen unterteilt. In der frühen Phase kommt es nach der Rezeptorbindung zur Expression der frühen viralen Gene (*immediate early* bzw. *early: E*). Die späte Phase wird durch die Expression der späten Gene (*late: L*) eingeleitet und endet mit der Freisetzung der Virionen durch die Zelllyse. Der Replikationszyklus benötigt 32 bis 36 Stunden [94]. Im Fol-

genden soll insbesondere auf Faktoren eingegangen werden, die bei der Entwicklung, der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren, eine besondere Rolle spielen.

Frühe Phase

Die frühe Phase setzt mit der Adsorption des Virus an die Wirtszelle ein. Dazu bindet die Knob-Domäne des viralen Fiberproteins an den Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) der Zielzelle [95,96]. Die Internalisierung erfolgt durch die zusätzliche Interaktion des Arginin-Glyzin-Aspartat-Motivs (RGD-Motiv) der Pentonbasis mit den zellulären $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen [97,98,99], infolgedessen eine Clathrin-vermittelte Endozytose stattfindet [99,100]. Aufgrund weiterer Wechselwirkungen wird das Viruspartikel ins Zytoplasma freigesetzt [101,102]. Die freien Viruspartikel gelangen zum Zellkern der Wirtszelle [103]. Die an die freie virale DNA gekoppelten terminalen Proteine binden an die Kernmembran und begünstigen die Initiation der Replikation [104].

E1A

Der Replikationszyklus beginnt mit der sofortigen Transkription des *immediate early E1A*-Gens [105], welches keine viralen Faktoren benötigt und somit autoreguliert ist [106]. Durch Spleißprozesse entstehen zwei Peptide **E1A-13S** (285 Aminosäuren) und E1A-12S (243 Aminosäuren). Diese haben die Aufgabe die Transkription weiterer früherer Gene (*E1B*, *E2*, *E3*, *E4*) einzuleiten [107] und die Zelle für den Eintritt in die S-Phase vorzubereiten. In der Synthesephase liegen die optimalen Bedingungen für die virale Replikation vor. Die E1A-Proteine binden mit ihren konservierten Regionen CR1 und CR2 (*conserved region*) das Tumorsuppressorprotein Retinoblastom (Rb) [108], was zur Folge hat, dass der Transkriptionsfaktor E2F aus dem Komplex mit dem Rb-Protein gelöst und die Transition in die S-Phase begünstigt wird [109]. E1A-13S besitzt CR1, CR2 und CR3 und ist allein zu sämtlichen Funktionen befähigt, die durch die *E1A*-Region kodiert sind. E1A-12S ist ein wesentlich schwächerer Aktivator, da dem Protein die CR3-Region und damit eine Bindungsstelle für bestimmte Faktoren fehlt [105].

E1B

Nachdem die *E1A*-Produkte die Expression der *E1B*-Region initialisiert haben, werden zwei E1B-Proteine (19 kD, 55 kD) gebildet [110,111], welche die Apoptose infizierter Zellen verhindern sollen [112]. Strukturell und funktionell ist **E1B-19K** dem zellulären antiapoptotischen BCL-2 sehr ähnlich. Durch die Hemmung des proapoptotischen Bax und Bak kann E1B-19K die Einleitung der Apoptose hemmen [113,114,115,116].

E1B-55K kann den Tumorsuppressor p53 binden [117,118]. Die Inaktivierung von p53 erleichtert den Eintritt in die S-Phase, da die Überwachungsinstanz für mögliche DNA-Schädigungen ausgeschaltet ist, gleichzeitig wird die Transkription von Bax-Proteinen verhindert [113]. E1B-55K spielt weiterhin während der späten Phase der adenoviralen Transkription, beim selektiven Transport der späten viralen Transkripte, eine Rolle [119].

E2

Die *E2*-Region ist in *E2A* und *E2B* unterteilt [120]. *E2A* kodiert für das DNA-bindende Protein (DBP), *E2B* für das terminale Protein (pTP-terminale Protein Precursor) und die virale Polymerase (Pol). Die **E2-Produkte** bilden mit zellulären Transkriptionsfaktoren den Initiationskomplex für die Replikation der viralen DNA und sind damit essentiell für die virale Replikation [121,122,123,124,125]. Die Expression der *E2*-Gene wird in der frühen Phase durch den *E2A*Early-Promotor reguliert. In der späten Phase des Infektionszyklus, nach Beginn der DNA-Replikation, hemmt *E1A* die Transkription über den *E2A*Early-Promotor, infolgedessen wird ein zweiter Promotor, *E2A*Late, aktiviert [126].

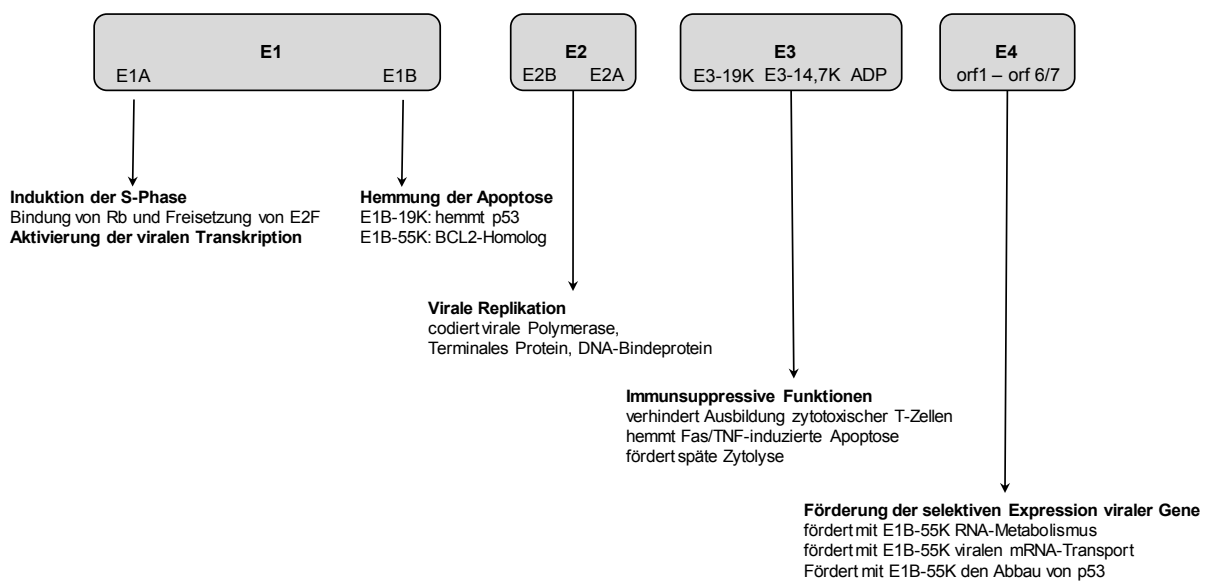


Abb. 3: Frühe Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms und ihre Funktionen

E3

Die **E3-Transkriptionseinheit** kodiert für immunsuppressive Funktionen (2 Mechanismen), die jedoch für die Replikation nicht essentiell sind. *In vivo* spielen die *E3*-Produkte als Modulatoren der Immunantwort eine Rolle und sind an der Verbreitung der Virionen mit beteiligt [127,128,129,130,131,132,133].

E4

Die *E4*-Region ist unterteilt in die 6 verschiedenen transkriptionellen Einheiten orf1-4, orf 6, sowie orf 6/7 (ORF-open reading frames). Die Genprodukte sind an der Förderung der selektiven Expression viraler Transkripte auf Kosten zellulärer Gene [134,135], an der Einleitung der adenoviralen Replikation [136], sowie dem Ausschalten der zellulären Proteinsynthese beteiligt.

Späte Phase

Der Beginn der viralen DNA-Replikation kennzeichnet den Übergang zur späten Phase des adenoviralen Infektionszyklus [137]. Die Expression der späten Gene wird durch den ML-Promotor (*major late*) gelenkt. Aus einem 33kb-langen mRNA-Vorläufer entstehen, durch differenzielle Spleißvorgänge, einzelne mRNAs, die in fünf Familien (L1 – L5) eingeteilt werden. Mit der Synthese der Strukturproteine beginnt auch die Assemblierung des Kapsids [138]. Nach Anreicherung von reifen Viruspartikeln [105] kommt es zum Zusammenbruch der Kernstruktur und zur Lyse der Zelle, die der Freisetzung der neuen Viruspartikel dient [139,140].

1.2.1.3 Konditional replizierende onkolytische Adenoviren

Schon früh wurden in der Literatur Beobachtungen von Tumorregressionen nach natürlichen Virusinfektionen oder Virusimpfungen beschrieben [141,142,143]. Es folgten einige Versuche in denen Patienten mit Tumorerkrankungen verschiedene Viren (Adeno-, Masern-, Mumpsviren) verabreicht wurden [144,145,146,147,148]. In den frühen 1990er Jahren limitierten Sicherheitsbedenken den Gebrauch von nicht-attenuierten, replikationskompetenten Viren. Es folgte die Entwicklung von verschiedenen adenoviralen Vektorsystemen, die durch Deletionen von Genen für die Virusvermehrung replikationsdefizient gemacht wurden und eine reduzierte Immunogenität aufweisen sollten. Dadurch entstanden die 1. und 2. Generation der adenoviralen Vektoren, die Deletionen in der *E1*- und *E3*-Region [149,150,151] bzw. zusätzlich der *E2*- und *E4*-Region aufweisen, sowie die *gutless*-Vektoren (auch HC-Ad-Vektoren: *high capacity adenoviral vectors*), die nur noch die ITRs (*inverted terminal repeats*) und das Verpackungssignal ψ tragen [72,152,153,154,155]. Das Hauptproblem dieser replikationsdefekten Viren ist mehr als ein paar Schichten des Tumors *in vivo* zu infizieren. Nur wenige Tumorzellen, in der Nähe des Injektionsortes, können somit das therapeutische Transgen für eine relative kurze Zeit exprimieren [156]. Unabhängig von der Krebsart und des konkreten Behandlungsansatzes war es nicht möglich einen signifikanten therapeutischen Effekt am Menschen mit einem der replikationsdefizienten Vektoren herbeizuführen [157,158,159,160].

Dieser Umstand führte zur Entwicklung bedingt replikationskompetenter Vektoren. Diese Konstrukte nutzen die Zelllyse, welche die direkte Konsequenz des adenoviralen Replikationszyklus ist [161]. In der Folge können die freigesetzten Viruspartikel neoplastische Nachbarzellen infizieren. Damit ist die Viroonkolyse nicht auf die Initialdosis beschränkt, sondern sollte sich theoretisch vervielfachen, mit dem Potenzial, jede Zelle des Tumors zu erreichen [161,162,163,164]. Bedingt replikationskompetenten Adenoviren (*conditionally replicating adenovirus: CRAAd*) sind nur unter bestimmten Voraussetzungen replikationsfähig und können eine Zelllyse induzieren. Um diese Selektivität zu erreichen, werden derzeit drei verschiedene Strategien verfolgt. In der folgenden Beschreibung der verschiedenen Konzepte wird überwiegend auf Modelle eingegangen, die für das in dieser Arbeit verwendete onkolytische Virus von Bedeutung sind.

Die erste Strategie betrifft die **Deletion von Genen**, die in normalen Zellen für die virale Replikation essentiell sind, aber in Tumorzellen mit spezifischen genetischen Alterationen, nicht benötigt werden. Nach der Identifikation von Mutationen, welche die virale Replikationskompetenz auf Tumorzellen beschränken, wurden verschiedene Vektoren entwickelt. Der erste und wohl bekannteste CRAd in der experimentellen Forschung, ONYX-015 (ad2/5 dl1520), besitzt eine Deletion für E1B-55K, und sollte sich spezifisch in neoplastischen Zellen mit einem defekten p53-Signalweg replizieren [165,166,167,168,169,170]. Später konnte aber belegt werden, dass die Replikation nicht abhängig vom p53-Status [119,171,172,173,174,175] war. Dennoch hat ONYX-015 prinzipiell die Sicherheit von CRAds am Patienten bewiesen, da es selbst nach Injektion von hohen adenoviralen Dosen neben dem resektiertem Gliom zu keinen Nebenwirkungen gekommen ist [176].

Ein weiterer Vektor der auf einer Deletion von essentiellen viralen Genen für die Replikation basiert ist das **dl520-Virus** [177]. Bei diesem Konstrukt liegt eine Deletion von CR3 im E1A-Gen vor. Die Region codiert für das E1A-13S-Protein, dem Transaktivator der frühen viralen Gene (*E1B*, *E2*, *E3*, *E4*), folglich kann dl520 nur noch eine stark eingeschränkte Replikation einleiten [107]. Neuere Studien belegen jedoch, dass eine nukleäre YB-1-Expression in den Wirtszellen eine effektive Replikation und Zelllyse ermöglicht [178].

Die zweite Möglichkeit befasst sich mit der **Substitution tumorspezifischer, heterologer Promotoren**, als Regulatoren für die virale Genexpression. Dabei wird die Transkription der für die Replikation relevanten Gene *E1* [179,180,181,182,183], *E2* [184] oder *E4* [183,185] unter die Kontrolle von heterologen Promotoren gestellt. Diese Promotoren sind gewebsspezifisch und/oder zellzyklusabhängig.

Beim dritten strategischen Ansatz geht es um die **Verbesserung der viralen Transduktion** von Zielzellen. Zu diesem Zweck kann man den Lysevorgang optimieren oder den natürlichen Tropismus des Vektors verändern. Im zweiten Fall ist das Ziel die ausschließliche Bindung des adenoviralen Vektors an tumorzellspezifische Rezeptoren. Der Cosackie- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) ist der primäre zelluläre Rezeptor für Adenoviren der Gruppe C [186,187,188], folglich korreliert seine Expression mit der Effizienz der adenoviralen Infektion. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CAR im malignen Gliom nur gering exprimiert ist [186,187,189,190,191,192], dahingegen aber auf epithelialen Normalgeweben stark eprimiert wird. Somit transduzieren Adenoviren in systemischen Ansätzen nicht nur Tumorzellen und insbesondere nicht verstärkt Gliomzellen. Untersuchungen zeigten, dass der Hauptteil der injizierten adenoviralen Vektoren die Kupferzellen in der Leber infizieren [193]. Deshalb werden Adenoviren in der Gentherapie bevorzugt bei *in situ*-Therapien verwendet. Neben CAR als primären Rezeptor fungieren zelluläre Integrine als sekundäre Rezeptoren. Weithin exprimiert spielen sie eine wichtige Rolle im malignen Phenotyp von Gliomen [192,194,195,196]. Integrine binden das **RGD-Motiv** der Pentonbasis [97,98,99]. Durch Addition dieses Bindemotivs für sekundäre Rezeptoren in die Knob-Domäne des Fiberproteins kann die virale Infektion CAR-defizienter Zellen erheblich gesteigert werden [190,197], was gleichzeitig zu einer höheren onkolytischen Aktivität führt.

Eine weitere Methode zur Verbesserung der viralen Transduktion ist die Optimierung des Lysevorgangs. Das ist nötig, weil die häufig vorgenommenen Deletionen viraler Gene, um eine Tumorselektivität zu erreichen (Strategie 1), aufgrund der multifunktionellen Natur vieler viraler Proteine, gleichzeitig in einer signifikant reduzierten antineoplastischen Aktivität resultieren [165,167,198]. Das adenovirale **E1B-19K** ist ein starker Inhibitor der Apoptose, eine Deletionsmutante (dl337) sollte, im Vergleich zum Wildtypvirus, die Apoptose effektiver einleiten können und eine höhere onkolytische Effizienz aufweisen. Für den Vektor dl337 konnte eine deutlich stärkere Induktion der Apoptose in Lungenkarzinomzellen gezeigt werden, dabei war die Zahl der infektiösen viralen Partikel im Überstand gegenüber dem Ad-wt erhöht. Die vorzeitige Freisetzung der Viren bewirkt eine verstärkte virale interzelluläre Ausbreitung, die in größeren Plaques resultiert [199].

1.2.1.1 Onkolytisches Adenovirus Ad5-Delo3RG und andere verwendete Adenoviren

Mit Hilfe der in Kapitel 1.2.1.3 beschriebenen Strategien wurden ausgehend vom humanen Adenovirus Subtyp C, Serogruppe 5 ein onkolytischer Vektor von der Arbeitsgruppe Dr. Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) konstruiert, der in dieser Arbeit neben Ad5-Ad312 und dem Wildtyp zur Anwendung kommt. Alle Vektoren enthalten 5' und 3' ITRs (*inverted terminal repeats*), das Verpackungssignal ψ , *E2*- und *E4*-Genregionen, sowie die späten adenoviralen Gene, die für die Morphogenese der neu gebildeten Virionen benötigt werden [150,159] (siehe Abb. 4). Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über die verwendeten Konstrukte geben.

Adenovirus Typ 5 -Wildtyp (Ad5-wt)

Das Adenovirus der Gattung *Mastadenovirus* der Spezies *humanes Adenovirus C*, Serogruppe 5 wurde als Wildtypvirus verwendet und genetisch nicht modifiziert. Infolgedessen weist Ad5-wt keine Veränderungen im Genom auf und ist dementsprechend replikationskompetent. Der natürliche Tropismus ist auf eine CAR-abhängige Infektion ausgerichtet.

Adenovirus Typ 5 -Ad312 (Ad5-Ad312)

Ad5-Ad312 hat eine *E1A*-Deletion [200] und kann folglich keines der adenoviralen Gene aktivieren. Nur sehr hohe MOI können eine Replikation ermöglichen [201].

Adenovirus Typ 5 -Delo3-RGD (Ad5-Delo3RGD)

Das neu entwickelte Virus besitzt im Vergleich zum Ad5-wt drei Deletionen, *E1A-13S*, *E1B-19K* und *E3*, sowie ein zusätzliches RGD-Motiv in der Knob-Domäne des Fiberproteins [202]. Diese Modifikationen finden sich in der Namensgebung von Ad5-Delo3RGD (*Deletion on 3 locations*: Deletionen an 3 Stellen des adenoviralen Genoms) wieder.

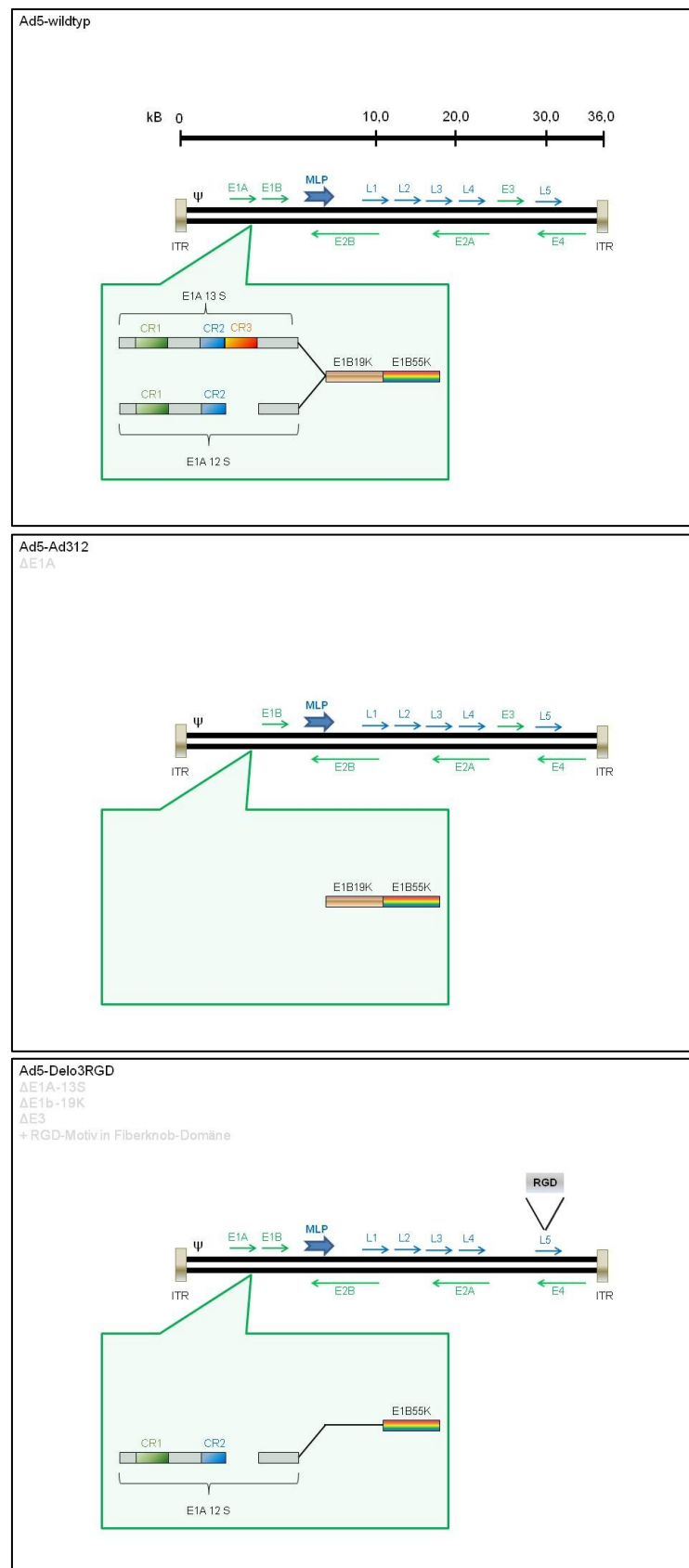


Abb. 4: Schematische Darstellungen der Genome von Ad5-wt, Ad5-312 und Ad5-Delo3RGD.

Abbildungen modifiziert nach [203].

Um eine Erweiterung des natürlichen Tropismus von Ad5-Viren zu erreichen und damit eine CAR-unabhängige Infektion zu gewährleisten, wurde das RGD-Motiv in die Knob-Domäne des Fiberproteins integriert. Aus stereotaktischen Gründen erfolgt die effizienteste Infektion durch eine Lokalisation des RGDs im HI-Loop [204]. Dabei bindet RGD die zellulären Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, die an der Internalisierung des Virus durch die Zelle beteiligt sind [205,206].

Eine Deletion liegt in der Region für *E1B-19K*, ein virales BCL2-Analogon. Durch das fehlende antiapoptotische Protein, während des viralen Replikationszyklus, können infizierte Zellen schneller die Apoptose einleiten. Daher ist eine effektive Vermehrung und Zelllyse nur in Tumorzellen möglich, in denen die Apoptose gehemmt ist [207]. Die Deletion von *E1B-19K* führt zu einer verstärkten Zelllyse und viraler Ausbreitung und damit zu einer Verbesserung der antineoplastischen (onkolytischen) Wirkung [199].

Eine weitere Deletion betrifft die *E3*-Region, um Kapazität für die Insertion eines therapeutischen Transgens zu schaffen. Die partielle oder vollständige Deletion der *E3*-Region, die dem Virus ermöglicht dem Immunsystem des Wirtsorganismus zu entgehen, kann *in vivo* zu einer gesteigerten Immunantwort führen [127,128,129,130,131,132,133].

Die dritte Deletion ist im *E1A*-Gen lokalisiert. Das onkolytische Adenovirus Ad-Delo3RGD ist ein sogenanntes dl520-Virus [208]. Dieses wurde 1984 erstmals von Haley *et al.* beschrieben und weist eine Deletion von 10 bp in der CR3-Region von *E1A*, zwischen dem 1107 bis 1117 bp vom 5'-Ende des Genoms, auf. Somit kann Ad-Delo3RGD lediglich das verkürzte E1A-12S-, jedoch nicht den stärkeren Transaktivator der viralen Transkription E1A-13S-Protein bilden und ist deshalb replikationsdefizient [105,209,210,211,212]. Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass Viren mit einer *E1A-13S*-Deletion (dlh520), abhängig vom YB-1-Status und dessen Lokalisation, zu einer Replikation in Zellen fähig sind [202,213,214,215,216]. Das folgende Kapitel geht aus diesem Grunde auf die Lokalisation und die Funktion von YB-1 in Tumorzellen ein.

1.3 Y-Box-Protein 1 (YB-1)

1988 wurde das Y-Box-Protein 1 (auch YB-1/dbpB/p50) erstmals, als Transkriptionsfaktor der an die Y-Box des MHC Klasse II Promotors bindet, beschrieben [217]. YB-1 ist hochkonserviert und übt pleiotrope Funktionen aus [218]. Es gehört zur Familie der CSD-Proteine (*cold-shock domain proteins*) und besteht aus drei Domänen. Der N-terminalen Domäne, der Nukleinsäurebindenden CS-Domäne [219] und der C-terminalen Schwanzdomäne. Letztere kann Protein-Protein-Interaktionen eingehen, weist eine hohe Affinität für die Bindung von einzelsträngiger DNA und RNA auf [220] und enthält außerdem eine Anhäufung von basischen bzw. sauren Aminosäuren (B/A-repeat). YB-1 bindet spezifisch an doppelsträngige DNA mit der Sequenz CTGAATTGG(C/T)(C/T)AA, die Y-Box benannt wurde und ferner als reverse CCAAT-Box bekannt ist [217].

1.3.1 Lokalisation

Hauptsächlich liegt YB-1 im Zytoplasma vor und ist dabei an ein Ankerprotein assoziiert [221]. Unter Stresseinwirkung wie Hyperthermie, UV-Strahlung, Bestrahlung oder Zytostatika transloziert das Y-Box Protein 1 jedoch in den Zellkern [213,218,221,222,223,224]. Viele Berichte belegen dass YB-1 in einer Vielzahl von Tumoren [225,226,227,228], u.a. in kolorektalen Karzinomen [229], Mammakarzinomen [230,231,232], Ovarialkarzinomen [233,234] oder Prostatakarzinomen [235], stark exprimiert ist. Im Brustkrebs dient der Nachweis von YB-1 sogar als prognostischer und prediktiver Marker [232] und auch bei Lungentumoren und Synovialsarkomen ist die nukleäre YB-1 Expression u.a. mit einer schlechten Prognose korreliert [225]. Im primären kindlichen Glioblastom konnte eine Überexpression von YB-1 bereits nachgewiesen werden [228]. Auch wenn beim parentalen Glioblastom dieser Nachweis noch fehlt, gibt es jedoch Anhaltspunkte, die auf eine YB-1-Expression schließen lassen. So ist YB-1 ein wichtiges Protein in der Hirnentwicklung [236]. Zudem zeigen differenzielle RNA-Expressionsanalysen von Patientenproben, dass YB-1 in Gliomrezidiv assoziierten neovaskulären Gefäßen, sowie in Glioblastomzellen überexprimiert ist [237].

1.3.2 Funktion

YB-1 ist ein multifunktionales Protein das in die Regulation von Transkription, Translation und RNA-Stoffwechsel, DNA-Reparatur und Resistenzmechanismen eingreift und damit essentielle biologische Prozesse regulieren kann [238]. Bei einer großen Anzahl von Genen, z.B. Zellzyklus regulierende Gene, ist die Y-Box im Promotorbereich enthalten, diese kann durch YB-1 gebunden werden [239].

Für die Regulation der Transkription existieren drei Modelle. Gene, die eine Y-Box in ihrer Promotorregion aufweisen, können direkt durch YB-1 in ihrer Expression beeinflusst werden [218,240,241]. YB-1 kann jedoch auch durch die Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren auf die Expression von Genen wirken [242,243,244]. Außerdem kann die C-terminale Schwanzdomäne hochaffin an einzelsträngige DNA binden und somit die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren fördern oder hemmen [245,246,247,248].

Neben der Transkription kontrolliert YB-1 ebenso die Translation [249,250], über RNA-Bindung oder Protein-Protein-Interaktionen. Y-Box-Protein 1 fördert Splicing [251] und ist gleichzeitig ein potenter, Cap-abhängiger Stabilisator der mRNA, der diese vor Degradation schützt [252]. Es konnte sogar eine sequenzspezifische mRNA-Bindung beobachtet werden [253] und die Regulation durch Wechselwirkung mit RNA-bindenden Proteinen wie IRP2 [254]. Desweiteren gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von YB-1 an DNA-Reparaturmechanismen. Das Protein besitzt eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität und wechselwirkt mit PCNA, einer Komponente die notwendig ist für Entfernung von Nukleotiden während der Reparatur [220].

Untersuchungen belegten, dass die Anwesenheit des Y-Box-Protein 1 mit Chemoresistenz korreliert [255]. Beispielsweise kann das Protein an die Y-Box im Promotorbereich des MDR1-Gens (*multidrug*

resistance 1) binden [223] und wurde ebenso in Zusammenhang mit der Sensitivität von Zellen gegenüber Cisplatin [256] und Temozolomid [257] gebracht.

1.3.3 Virale Wechselwirkungen

Zusätzlich zu den genannten vielfältigen zellulären Funktionen von YB-1 konnten ebenso spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und viralen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Dabei interagiert YB-1 beispielsweise mit dem *long terminal repeat* (LTR) des Rous-Sarkom-Virus (RSV) [258] bzw. der *Enhancer*-Region des humanen Papillomavirus Typ 18 (HPV 18) [259]. Beim humanen neurotrophen JC-Polyoma-Virus kann YB-1 die Transkription steigern, indem es die Affinität der Transkriptions-Kontroll-Region erhöht [260].

Für den in dieser Arbeit verwendeten Adenovirus Typ 5 wurde beschrieben, dass YB-1 an der Replikation des Virus beteiligt ist. Die *E2*-Genprodukte sind essentiell für die Replikation des Virusgenoms, da sie zusammen mit zellulären Faktoren den Initiationskomplex bilden [121,122,123,124,125]. Normalerweise veranlasst das *immediate early* Gen *E1A* in der frühen Phase der Infektion eine transkriptionelle Aktivierung der *E2*-Genregion über den *E2Early* Promotor, indem es mit dem Tumorsuppressor Rb wechselwirkt und somit den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert, welcher u.a. an den Promotor binden kann [261,262,263,264].

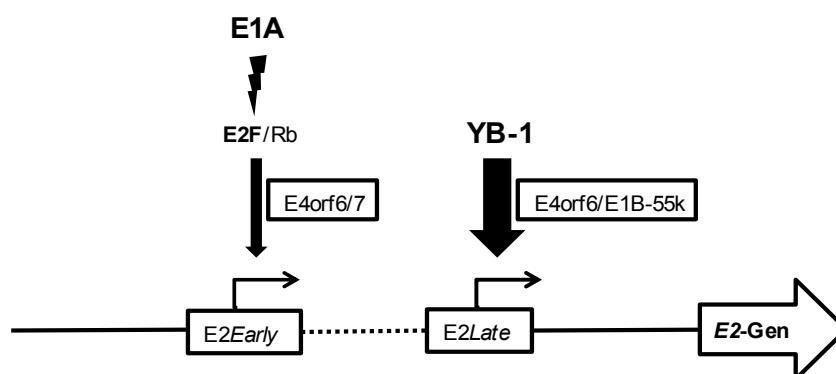


Abb. 5: Schematische Darstellung der Genregulation der *E2*-Region [265].

E1A induziert durch die Wechselwirkung mit dem Retinoblastomprotein (Rb) die Freisetzung von E2F, das infolgedessen den *E2Early* Promotor bindet. Die Bindung wird durch E4orf6/7 stabilisiert und die Transkription der *E2*-Gene induziert. Der *E2Late* Promotor hingegen wird durch YB-1 aktiviert. Dabei ist der virale E4orf6/E1B-55K-Komplex an der nukleären Translokation von YB-1 beteiligt [265].

Ein Vektor mit einer Deletion der *E1A*-Region kann sich somit nicht mehr effizient in Zellen replizieren. Dennoch zeigten E1-Deletanten in Tumorzellen bei höheren einer höheren Viruslast pro Zelle eine Replikation [266]. Liegt das Protein YB-1 im Kern vor, kann es eine Transkription der *E2*-

Region induzieren, indem es an die drei Y-Boxen des *E2ALate* Promotors bindet und damit die Genexpression aktiviert [178,214,267]. Liegt YB-1 jedoch zytoplasmatisch vor, können sich E1-Deletanten nur schwach oder gar nicht replizieren, wohingegen E1A-deletierte (Ad5-Ad312) bzw. -mutierte (Ad5-Delo3RGD) Viren sich replizieren können und dementsprechend eine Zelllyse induzieren [214]. Diese Fähigkeit ist dem Umstand geschuldet, dass *E1A*-deletierte bzw. mutierte Viren den E1B-55K/E4orf6-Komplex bilden, welcher an der nukleären Translokation von YB-1 beteiligt ist [178,214,265].

Der *E2Early* Promotor wird also durch E2F aktiviert, wohingegen die Transkription der *E2*-Gene über den *E2Late* Promotor durch YB-1 gesteuert wird (Abb. 5). Der *E2Late* Promotor kontrolliert die Expression der E2-Produkte in einer späteren Phase der Infektion [263,268,269,270].

Damit besitzt YB-1 eine biologische Aktivität, die der des viralen E1A-Proteins entspricht (*E1A-like activity*) [271]. Diese Fähigkeit ist sehr nützlich für die Entwicklung von adenoviralen Vektoren.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Glioblastom ist der bösartigste astrozytäre Tumor. Aufgrund seiner Therapieresistenz gegenüber konventionellen Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose sehr schlecht, eine Aussicht auf Heilung besteht bislang nicht.

Allerdings zeigte das neuartige onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD im Pankreas- und Gliommodell potente antitumorale Aktivitäten, die in Kombination mit Chemotherapie verstärkt werden konnten [202,216].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu beweisen, dass die Transduktion von Gliomzellen mit adenoviralen Vektoren zu einer Änderung der globalen Genexpression der neoplastischen Zellen führt. Diese Modifikationen sind abhängig vom viralen *E1A*-Gen-Status, welcher maßgeblich für die Replikationskompetenz verantwortlich ist. Entsprechend werden *E1A*-wildtyp (Ad5-Wildtyp), *E1A*-mutierte (Ad5-Delo3RGD) und *E1A*-deletierte (Ad5-Ad312) Vektoren verwendet, um die unterschiedlichen biologischen Effekte darzustellen.

Ein globales Screening der veränderten Expressionsprofile mittels *Microarray*-Technologie dient der Identifikation von Faktoren, die eine Relevanz in der Ad5-Delo3RGD-Therapie besitzen. Diese Faktoren sollen weiteren funktionellen Untersuchungen, wie *real-time* RT-PCR, Western Blot und ELISA, sowie Reporterassays, zugeführt werden, um ihre biologische Relevanz *in vitro* zu validieren.

Die Erkenntnisse über die biologische Wirksamkeit dieser Faktoren im Kontext einer Ad5-Delo3RGD-basierten Therapie, kann zur Optimierung der gentherapeutischen Behandlung genutzt werden.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Gliomzelllinien wurden von Dr. Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) und Dr. Naumann (Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Universitätsklinikums Tübingen) bereitgestellt und vor ihrer Verwendung durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ GmbH) auf ihre Identität und Kreuzkontamination mit anderen humanen Zelllinien bzw. Mycoplasmen getestet. Die Untersuchung ergab, dass alle Zelllinien authentisch und nicht kontaminiert sind, sowie dass U-373MG ein Subklon der Linie U-251MG ist [272,273].

Für die Zelllinien LN-18, U-373MG und U-87MG ist bereits in der Literatur beschrieben, dass sie eine vornehmlich zytoplasmatische, perinukleäre, Lokalisation von YB-1 aufweisen [213].

Tab. 2: Verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Referenz
LN-18	Glioblastom (WHO-Grad IV)	[274]
LN-229	Glioblastom (WHO-Grad IV)	[272]
U-87MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	[275]
U-373MG	Glioblastom (WHO-Grad IV)	[275]
(Subklon U-251)		
HEK-293A	Ad5 transformierte, humane embryonale Nierenzellen; Subklon von HEK-293	[276]

HEK-293A

Die adhärent wachsende humane, embryonale Nierenzelllinie HEK-293A (*human embryonal kidney*) wird häufig zur Vermehrung replikationsinkompetenter Adenoviren verwendet, weil die Zellen permissiv für die Infektion mit Ad5 sind. Die Zelllinie enthält einen Teil des adenoviralen Genoms von den Nukleotiden 1 bis 4344 [277] und exprimiert somit die *E1A*- und *E1B*-Genprodukte *in trans* [276].

2.3 Viren

Die in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren wurden freundlicherweise von Dr. Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

2.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ erworben.

Chemikalien	Hersteller
2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate (dNTPs, je 10 mM)	Promega GmbH
2-Propanol	J.T. Baker
Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	Qbiogene
Agarose Ultra Pure™	Invitrogen GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Beta-Mercaptoethanol	Promega GmbH
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega GmbH
Bromphenol blau	Merck
Cäsium Chlorid, <i>Grade II</i>	Sigma-Aldrich
<i>Complete</i> (Proteinase-Inhibitor)	Roche Diagnostics
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)	Cambrex
D-PBS (10 x)	Invitrogen GmbH
Entwickler RP X-OAT EX	Eastman Kodak
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	SERVA Electrophoresis
ExpressHyb™ Hybridization Solution	BD Biosciences – Clontech

Fixierer RP X-OMAT LO	Eastman Kodak
Formaldehyd (37 %)	J.T. Baker
Formamid	Merck
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Glyzerin (pflanzlich)	SERVA Electrophoresis
Kaliumhydroxid	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Cambrex Bio Science
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories
Magermilch (skim milk)	Difco Laboratories
Methanol	J.T. Baker
Molekularbiologisches Wasser	Eppendorf
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, TMEDA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumazetat	Merck
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	Biochrom
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenkarbonat	Merck
Nuklease free Water	Promega GmbH
NovaRed	Vector Laboratories
OptiMEM® mit GlutaMax™ I	Invitrogen GmbH
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck

Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS (10 x)	Biochrom
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH

2.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Anti-rabbit IgG</i> , HRP konjugiert	Cell Signaling Technology, Inc.
β -Catenin (6B3), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Goat anti-Mouse IgG</i> , (H+L), Peroxidase konjugiert	Perbio Science
<i>Mouse anti-actin monoclonal antibody</i> (Ms X Actin)	Chemicon International, Inc
Phospho-Smad2 (Ser465/467) (138D4), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
Phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
phospho- β -Catenin (6B3), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
Smad2 (86F7), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
Smad3 (C67H9), <i>Rabbit mAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.
YB1 Antibody, <i>Rabbit pAb</i>	Cell Signaling Technology, Inc.

2.1 Kits

Kits	Hersteller
AdEasy™ Viral Titer Kit	Stratagene
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen GmbH
Amersham Megaprime DNA Labeling Systgems	GE Healthcare
Signal™ SMAD Reporter (luc) Kit	SABiosciences
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences Europe
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH
Quantikine® Human TGF-β1 Immunoassay	R&D Systems
Quantikine® Human TGF-β2 Immunoassay	R&D Systems
Quantikine® Human VEGF Immunoassay	R&D Systems
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Perbio Science
SuperScript™ First-Strand Synthesis System	Invitrogen GmbH
TrueStart™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic

2.2 Enzyme

Enzyme	Hersteller
FastDigest® <i>KpnI</i>	Fermentas GmbH
RNase-Free DNase Set (50)	Qiagen GmbH
SureFect™ Transfection Reagent	SABiosciences

2.3 Zytokine

Enzyme	Hersteller
Recombinant Human TGF-beta 1	R&D Systems AG
Recombinant Human TGF-beta 2	R&D Systems AG

2.1 Radionukleotid

Radionukleotide	Hersteller
³² α P dCTP 10 mCi/ml (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences

2.2 Nukleinsäuren

Nukleinsäuren	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH
Oligonukleotide für PCR (Tab. 3)	Eurofins MWG Operon
Oligonukleotide für <i>real-time</i> RT-PCR (Tab. 4)	Eurofins MWG Operon

2.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Expositionskassette (Hypercassette)	Amersham Biosciences
Gelelektrophoresekammer - mini Protean II	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoresekammer - wide mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Hybridisierungssofen OV1	Biometra
Inverses Forschungsmikroskop Axiovert CFL	Zeiss
Inverses Forschungsmikroskop DMIL	Leica
Inverses Forschungsmikroskop IMT-2	Olympus Optical Co. GmbH
Laborwaage BL1500S	Sartorius AG
LightCycler™	Roche Diagnostics GmbH
Magnetrührer RCT Basic	IKA-Labortechnik
MP 220 pH-Meter	Mettler Toledo GmbH
Multikanalpipette	Eppendorf
Nalgene Cryos 1 °C Freezing Container	Nalgene Europe
Pipetboy acu	Integra Bioscience
Reinstwasseranlage Milli-RO 10/Milli-Q Plus	Millipore Corp.

SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Steril-Bank Lamin Air HBB 2448	Heraeus Instruments GmbH
Steril-Bank Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments GmbH
Stromversorgungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Trio Thermoblock	Biometra
UV-Transilluminator	MWG-Biotech AG
Varioklav 75S	H+P Labortechnik
Vortex VF 2	IKA-Labortechnik
Wasserbad 1002	GFL mbH
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	HBG

Zentrifugen:

- GS-6KR	Beckman Coulter
- GPK	Beckman Coulter
- Optima LE80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
- Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf

2.4 Software

Software	Hersteller
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ExPASy Proteomics Server	http://www.expasy.ch/sprot/
Firefox Version 3.6.6.	Mozilla Foundation
GCOS 1.4.	Affymetrix
GeneSpring software package 6.1.	Silicon Genetics
GraphPad Prism® 3.02	GraphPad Software

Color Pathway	http://www.genome.jp/kegg/
LightCycler Software 3.0	Roche
<i>Microarray</i> Suite 5.0	Affymetrix
Microplate Manager 5.2.1. (ELISA-Reader)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation
Primer 3 (v. 0.4.0)	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
RealQuant – Relative Quantification Software 1.0	Roche Diagnostics

2.5 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf bezogen. Von der Firma Falcon wurden die Materialien für die Zellkultur wie Kultivierungsgefäße, serologische Pipetten und Proberöhrchen verwendet. Glasgefäße wurden bei der Firma Schott bestellt.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Chamber Slide System (LAB-TEK II)	Nalge Nunc International
Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman
Dialyse Kassetten (<i>Slide-A-Lyzer</i> 10,000 MWCO)	Perbio Science
Einfrierröhrchen Cellstar Cryos	Greiner Bio-One
Einmal-Küvetten Plastibran®	Brand GmbH + Co KG
Handschuhe SafeSkin SatinPlus	Kimberley-Clark
GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array	Affymetrix
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH
Kodak BioMax MR Film	Eastman Kodak
Light Cycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics
Nylontransfermembran Hybond™-N+	Amersham Biosciences Europe GmbH
Protran BA 85 Zellulosenitrat	Schleicher & Schuell
Ultra Clear Centrifuge Tubes	Beckman

3 Methoden

3.1 Zellen und Zellkultur

3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank unter ausschließlicher Verwendung von sterilen Verbrauchsmaterialien und Lösungen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Die Gliomzelllinien LN-18, LN-299, U-373MG, sowie U-87MG und die embryonale Nierenzelllinie HEK-293A (*human embryonal kidney*) wurden in Dulbecco's DMEM Medium mit 10 % FKS und 4 mM L-Glutamin kultiviert.

Je nach Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel bzw. die Subkultivierung alle 3-4 Tage. Für die Passagierung der Zellen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen zuerst mit 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und im Weiteren zum Lösen der Zellen erneut mit der Lösung versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C bis sich die Zellen vollständig vom Kulturgefäß gelöst hatten und vereinzelt vorlagen. Eine entsprechende Menge an Zellen wurde im Zellkulturgefäß belassen und mit Medium versetzt.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % trypsiniert und danach mit Medium versetzt, um die Trypsinreaktion zu inhibieren. Anschließend erfolgte die Pelletierung bei 1.000 rpm für 5 min (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter). Die Zellen wurden in einer Mischung aus 95 % FKS und 5 % DMSO resuspendiert und in 1 mL Aliquots in Einfrierröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C oder bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Medium auf 10 mL aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 1.000 rpm für 5 min (Zentrifuge GS-6KR, Beckman-Coulter) zentrifugiert, in Kulturmedium resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolation zellulärer DNA aus Gliomzellen, die nach der Transduktion durch Adenoviren auch adenovirale DNA enthält, wurde säulenchromatographisch mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen GmbH) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Eine Kurzzeitlagerungen der DNA fand bei 4 °C statt.

3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die photometrische Messung von Nukleinsäuren erfolgte in einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäure-Absorptionsmaximum) und 280 nm (Protein-Absorptionsmaximum). Die Berechnung der DNA- bzw. RNA-Konzentration resultierte unter Berücksichtigung der Verdünnung aus dem folgenden Verhältnis: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}$ entspricht 50 µg/mL doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/mL RNA.

Für die Beurteilung der Reinheit von Nukleinsäuren wird die Ratio von A_{260}/A_{280} gebildet, dabei gilt, dass der Faktor für eine reine DNA-Lösung bei 1,8 für eine RNA-Lösung bei 2,0 liegen sollte.

3.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Behandlung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers in 20 µL Ansätzen.

3.2.4 Southern Blot-Analyse

Für den Nachweis der Replikation von Adenoviren in Gliomzelllinien wurde mit der adenoviralen DNA, die in der Isolation der Gesamt-DNA der transduzierten Zellen enthalten ist, eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

2 µg zelluläre DNA (Kapitel 3.2.1) wurden mit der Restriktionsendonuklease FastDigest®*KpnI* (Fermentas GmbH) für 15 min bei 37 °C verdaut. Bei 80 °C wurde *KpnI* für 5 min inaktiviert. Anschließend erfolgte der Auftrag auf ein 1 %-iges Agarosegel und wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 3.2.10.). Bei vorsichtigem Schwenken fand zuerst die Depurinisierung für 30 min in 0,25 N HCl statt. Hierbei kommt es zu einer Fragmentierung hochmolekularer DNA, was zu einer guten Vorbereitung für einen optimalen Transfer beiträgt und damit die Sensitivität verbessern kann. Nach der folgenden Denaturierung für zweimal 30 min in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH und der abschließenden Neutralisation für zweimal 15 min in 1,5 M NaCl/1 M Tris-Base bei pH 7,4 min liegen die DNA-Fragmente einzelsträngig vor und können auf die Nylonmembran transferiert werden.

Kapillartransfer

Der Transfer der DNA auf die positiv geladene Nylonmembran fand in 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl/0,15 M Na₃-Citrat) mittels reversem Kapillarblotverfahren statt [278]. Hierfür wurden auf eine etwa 10 cm hohe Zelluloseschicht zwei gelgroße in 10 x SSC-Puffer getränkte Chromatographiepapierstreifen, gefolgt von der Nylonmembran und dem präparierten Agarosegel geschichtet, wiederum gefolgt von zwei in Puffer getränkten Chromatographiepapieren und einem Schwamm. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht.

Durch den mit 10 x SSC-Puffer vollgesogenen Schwamm wirkt ein Druck auf das DNA-Gel in Richtung Nylonmembran, zusätzlich wird die hochkonzentrierte Salzlösung durch das trockene Papier der Zelluloseschicht angezogen. Dabei gelangt die Lösung erst durch das Gel und dann an die Nylonmembran, wo die DNA aufgehalten wird und so in der gleichen Konfiguration wie sie im Gel bestand an der Membran haften bleibt. Für die Fixierung der DNA auf der Nylonmembran wurde diese für 2 h bei 80 °C im Vakuum gebacken. Die so an der Nylonmembran fixierte und immobilisierte DNA kann nun mit einer spezifischen Sonde hybridisiert werden.

Radioaktive Sondenmarkierung

Die frisch amplifizierten PCR-Produkte (Kapitel 3.2.7) wurden aufgereinigt (Kapitel 3.2.9), um anschließend als Sonde verwendet werden zu können. Dazu wurde die Insertion von ³²P-dCTP in 25 ng aufgereinigtem PCR-Produkt mittels Megaprime DNA Labelling System (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Radioaktive Hybridisierung

Die Prähybridisierung der auf die Nylonmembran fixierten DNA erfolgte mit *ExpressHyb* Hybridisierungslösung (BD Biosciences) bei 65 °C für 1 h. Die Hybridisierung der DNA-Fragmente mit der spezifisch komplementären radioaktiv markierten Sonde erfolgte bei 60 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran zweimal für 30 min bei 37 °C mit dem Wasch-Puffer 1 (2 x SSC/0,1 % SDS) und zweimal für 30 min bei 55 °C mit dem Wasch-Puffer 2 (0,1 x SSC/0,1 % SDS) gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen.

Die Exposition der hybridisierten und somit radioaktivmarkierten Membranen fand bei –80 °C in Expositionskassetten mit Verstärkerfolien statt.

3.2.5 Isolation zellulärer RNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Gliomzellen wurde das Trypsinat mit 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde, je nach Zellzahl, in 350 µL oder 600 µL RLT Puffer mit 2-β-Mercaptoethanol (1:100) resuspendiert und bis zur Isolation bei –80 °C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers, einschließlich des im Protokoll aufgeführten optionalen Verdaus von genomischen DNA-Verunreinigungen mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH).

3.2.6 Reverse Transkription

1 µg Gesamt-RNA (Kapitel 3.2.5) wurde durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase SuperScript II und Hexanukleotid-Zufallsprimer mit Hilfe des SuperScript™ First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen GmbH) in cDNA transkribiert.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte durch die Polymerasekettenreaktion wurde die TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas GmbH) verwendet. Dabei wurde folgender Ansatz pipettiert:

	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polymerase	0,2 µL	1 Unit
10 x TrueStart™ Hot Start Taq-Puffer	2,5 µL	1 x
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µL	200 µM
5'-Primer (5 µM)	1,0 µL	200 nM
3'-Primer (5 µM)	1,0 µL	200 nM
Matrize (cDNA oder genomische DNA)	1,0 µL	10-100 ng
Nuklease freies Wasser	auf 25,0 µL	

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	
1.	2 min	94 °C	Aktivierung der Polymerase
2.	30 / 60 s	94 °C	Denaturierung der dsDNA
3.	45 / 90 s	Tab. 3	Annealing der Primer an die ssDNA
4.	45 / 90 s	72 °C	Elongation der Primer durch die Polymerase
5.	10 min	72 °C	Extension
6.	∞	4 °C	Kühlung

Die Dauer der Schritte 2 bis 4 wurden je nach Größe des zu amplifizierendem Produkts gewählt und 40- bzw. 45-mal wiederholt.

Die Sequenzen der in der PCR eingesetzten Primer wurden freundlicherweise von Dr. Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) bereitgestellt. Die Synthese fand durch Eurofins MWG Operon (Reinheitsgrad HPLC) statt.

Tab. 3: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide, alphabetisch geordnet

Gensymbol	Gene Bank Nummer	Amplikon-länge (bp)	T _{Annealing} (°C)	Sequenz (5'-3')
E1A	AC000008.1	1040	51	fw: ATG GCC GCC AGT CTT TTG rev: GCC ATG CAA GTT AAA CAT TAT C
E1A 13 S	AC000008.1	527	51	fw: ATGGCCGCCAGTCTTTTG rev: CCATAATTTTCACTTACTGTAG

3.2.8 *Real-time* RT-PCR im LightCycler™

Für die quantitative Analyse einer spezifischen mRNA-Expression wurde eine *real-time* RT-PCR mit dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) unter Verwendung eines LightCyclers durchgeführt. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
Nuklease freies Wasser	12,8 µL	
DNA Master SYBR Green I	2,0 µL	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µL	1,5 mM
5'-Primer (10 µM)	1,0 µL	500 nM
3'-Primer (10 µM)	1,0 µL	500 nM
cDNA (1:20)	2,0 µL	

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm, dabei wurden die Schritte 2 bis 5 je nach zu amplifizierendem Produkt 40- bzw. 45-mal durchlaufen:

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>	
1.	10 min	95 °C	Aktivierung der Polymerase
2.	15 s	95 °C	Denaturierung der dsDNA
3.	5 s	Tab. 4	Annealing der Primer an die ssDNA
4.	15 s	72 °C	Elongation der Primer
5.	5 s	T_{mess}	Messung der spezifischen Genprodukte
6.	0 s	95 °C	Schmelzkurve
7.	15 s	65 °C	Schmelzkurve
8.	0 s	65-95 °C	Schmelzkurve
9.	30 s	40 °C	Abkühlung

Schmelzkurvenanalyse

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green I* interkaliert ausschließlich in doppelsträngige DNA. Nach Anregung emittiert der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex ein Lichtsignal bei 520 nm, welches proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes ist.

Die Spezifität des Amplifikationsprodukts wurde zuvor durch eine Schmelzkurvenanalyse bei einem Probelauf überprüft. Bei der anschließenden Auswertung wurde die Messtemperatur (T_{mess}) für die Quantifizierung so gewählt, dass das spezifische Genprodukt noch doppelsträngig und eventuell vorhandene Primer-Dimere als Einzelstränge vorlagen und damit nicht in die Analyse mit eingehen konnten.

Relative Kalibrator-normalisierte Quantifizierung mit Effizienzkorrektur

Die relative Quantifizierung fand mittels RealQuant – Relative Quantification Software 1.0 statt.

Dazu wurden serielle 1:2-Verdünnungsreihen mit einer cDNA der verwendeten Zelllinien vermessen und sogenannte Effizienzkorrektur-Algorithmen generiert. Dabei werden die relativen Standardkurven zur Berechnung der Konzentrationsverhältnisse, unter Berücksichtigung von PCR-Effizienzunterschieden zwischen Targetgen und Referenzgen genutzt.

Für die Auswahl des Referenzgens erfolgte eine Austestung verschiedener *Housekeeping*-Gene. Aufgrund des Expressionslevels und einer niedrigen Standardabweichung zwischen unbehandelten und

Virus behandelten Zellen wurden 18S rRNA und GAPDH ausgewählt. Die dargestellten *Fold Change*-Werte sind auf die 18S rRNA-Expression bezogen. GAPDH dient als Kontrollgen, für den Fall, dass sich im Nachhinein herausstellen sollte, dass die Transduktion mit Viren doch einen Einfluss auf die Expression von 18S rRNA hat. In den durchgeführten Messungen und Berechnungen bestätigten jedoch die GAPDH bezogenen Ergebnisse, die 18S rRNA normalisierten Werte.

Für die Reduktion von Lauf-zu-Lauf-Variationen wurde bei jeder PCR ein Kalibrator vermessen, auf dessen Expression die Expression der Proben nach folgender Formel bezogen wurde:

$$\text{normalisierte Ratio} = \frac{\frac{\text{Konzentration Targetgen (Probe)}}{\text{Konzentration Referenzgen (Probe)}}}{\frac{\text{Konzentration Targetgen (Kalibrator)}}{\text{Konzentration Referenzgen (Kalibrator)}}}$$

Prinzipiell kann jede beliebige cDNA-Vergleichsprobe, die eine Expression des Target- und Referenzgens aufweist, als Kalibrator dienen.

Anschließend erfolgte, zur Angabe der differentiellen Expression eines Gens, die Berechnung der *Fold Change*-Werte nach folgender Formel:

$$\text{Fold Change} = \text{Vorzeichen} \left(\log_2 \frac{\text{normalisierte Ratio}_{\text{Probe}}}{\text{normalisierte Ratio}_{\text{Kontrolle}}} \right) \times 2^{\left| \log_2 \left(\frac{\text{normalisierte Ratio}_{\text{Probe}}}{\text{normalisierte Ratio}_{\text{Kontrolle}}} \right) \right|}$$

Bei der Beurteilung der Werte wurde ein *Fold Change* von ≥ 2 bzw. ≤ -2 als signifikant differentiell exprimiert angesehen. Dies entspricht einer mindestens zweifach erhöhten bzw. erniedrigten relativen Expression. Die Umrechnung erfolgte für eine bessere Vergleichbarkeit der Expressionsdaten der *real-time* RT-PCR und des *Microarray*.

Die in der *real-time* RT-PCR eingesetzten Primer (Tab. 4) für die Targetgene wurden im Rahmen dieser Arbeit designt und optimiert, mit Ausnahme der Primer für VEGF-A [279] und c-Myc [280].

Die Synthese der Primer fand durch Eurofins MWG Operon (Reinheitsgrad HPLC) statt

Tab. 4: Sequenzen der für die *real-time* RT-PCR verwendeten Oligonukleotide, alphabetisch geordnet

Gensymbol	Gene Bank Nummer	Amplikon-länge (bp)	T_{Annealing} / T_{Mess} (°C)	Sequenz (5'-3')
18S rRNA	NM_022551.2	236	58/83	fw: GAT ATG CTC ATG TGG TGT TG rev: AAT CTT CTT CAG TCG CTC CA
β-Catenin	NM_001098209.1	237	58/82	fw: CCC ACT AAT GTC CAG CGT TT rev: AAC GCA TGA TAG CGT GTC TG
BCL2L1	NM_138578.1	153	58/86	fw: CAT GGC AGC AGT AAA GCA AG rev: TCC CGG AAG AGT TCA TTC AC
BNIP3L	NM_004331.2	190	58/82	fw: AGC AGG GAC CAT AGC TCT CA rev: TCA TGG CTC CAC TTT TCC TC
CALR	NM_004343.2	231	59/85	fw: TCT CAG TTC CGG CAA GTT CT rev: TCT GAG TCT CCG TGC ATG TC
MYC	NM_002467.3	117	53/82	fw: ACC ACC AGC AGC GAC TCT GA rev: TCC AGC AGA AGG TGA TCC AGA CT
DHFR	NM_000791.2	231	60/78	fw: CCT GGT TCT CCA TTC CTG AG rev: GTT TAA GAT GGC CTG GGT GA
DKK1	NM_012242.2	157	57/80	fw: TCC GAG GAG AAA TTG AGG AA rev: CCT GAG GCA CAG TCT GAT GA
FADD	NM_003824.2	181	59/86	fw: GGC TCG TCA GCT CAA AGT CT rev: GTC AGC CAC CAG GTT CAT CT
FST	NM_013409.1	236	54/86	fw: GAC TGT GGA CCT GGG AAA AA rev: GAG CTG CCT GGA CAG AAA AC
GAPDH	NM_002046.3	557	60/87	fw: CAC CGT CAA GGC TGA GAA C rev: ACC ACT GAC ACG TTG GCA G

IGF1R	NM_002228.3	120	58/85	fw: CCC CAA GAT CCT GAA ACA GA rev: CCG TTG CTG GAC TGG ATT AT
JUN	NM_002228.3	168	58/91	fw: CCC CAA GAT CCT GAA ACA GA rev: CCG TTG CTG GAC TGG ATT AT
LTBP1	NM_206943.1	172	58/86	fw: CTT CCG CTG CCT CTG TTA TC rev: CAT GGG GCT GTA CTC TTG GT
MCL1	NM_021960.3	184	58/83	fw: AGA AAG CTG CAT CGA ACC AT rev: ACC AGC TCC TAC TCC AGC AA
NFKBIA	NM_020529.1	197	59/86	fw: CTA CAC CTT GCC TGT GAG CA rev: TCC TGA GCA TTG ACA TCA GC
SMAD2	NM_001003652.2	223	53/82	fw: CGA AATG CCA CGG TAG AAA T rev: CCA GAA GAG CAG CAA ATT CC
SMAD3	NM_005902.3	173	55/85	fw: CCC CAG AGC AAT ATT CCA GA rev: GGC TCG CAG TAG GTA ACT GG
TOP2A	NM_001067.2	158	60/79	fw: TCA GAA CAT GGA CCC AGA CA rev: TGC CTC TGC CAG TTT TTC TT
VEGF-A	NM_001033756.1	292	60/81	fw: GCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GG rev: TTC TGT CGA TGG TGA TGG TGT GG

3.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte säulenchromatographisch mittels des *QIAquick PCR Purification* Kit (Qiagen GmbH) nach Angaben des Herstellers.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden 1,0 oder 2,0 %-ige [w/v] Agarosegele in 1 x TAE-Puffer (0,04 mM Tris-Base, 0,11 % Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet.

Vor dem Auftrag wurde die DNA mit 6 x Blue/Orange Loading Dye (Promega GmbH) versetzt. Als Größenstandards wurde je nach aufzutrennender DNA ein 100 bp- oder ein 1 kb DNA-Marker

(Fermentas GmbH) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 80-90 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

3.2.11 *Microarray*-Analyse

Für eine globale Expressionsanalyse von Gliomzellen nach Transduktion durch adenovirale Vektoren wurden die *Microarrays* des GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix) verwendet. Die HG-U133A 2.0-Oligonukleotid*Microarrays* beinhalten 22.000 SONDENSETS, die über 18.400 Transkripte bzw. 14.500 humane Gene präsentieren.

Die grundsätzlichen bioinformatischen Auswertungen, wie Normalisierung, *Fold Change*-Berechnungen oder *Gene Set Enrichment Analysis*, wurden freundlicherweise von Dr. R.-J. Kuban und Dr. J. Budczies durchgeführt. Die Identifikation von differenziell exprimierten Genen eines Signalwegs, sowie Schnittmengenanalysen z.B. der *Gene Set Enrichment* Analysen wurden selbstständig vorgenommen.

Die Probengewinnung wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) durchgeführt. Dazu wurden die Gliomzelllinien LN-18, U-373MG und U-87MG mit jeweils 10 MOI Ad5-wt, Ad5-Ad312 und Ad5-Delo3RGD transduziert bzw. als Kontrolle nur mit dem Transduktionsmedium behandelt. 48 Stunden nach Infektion mit Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD bzw. 72 Stunden nach Infektion mit Ad5-Ad312 oder dem Transfektionsmedium (Negativkontrolle) wurden die Proben geerntet. Die sich anschließenden Arbeitsschritte zur Hybridisierung der *Microarrays* erfolgte durch Dr. U. Ungethüm. Die Gesamt-RNA wurde für eine reverse Transkription genutzt. Die resultierende cDNA wiederum wurde in Anwesenheit biotinylierter Ribonukleotide in antisense-cRNA umgeschrieben (BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Life Science)), amplifiziert und in kürzere Stücke fragmentiert. Die Biotin-markierten cRNA-Fragmente wurden an die Oligonukleotid-Sonden der *Microarrays* hybridisiert, wobei ungebundene Fragmente durch Waschschritte entfernt wurden. Nach einer Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin und einem biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörper konnte die Phycoerythrin-Fluoreszenz mit einem hochauflösenden Scanner (Agilent G2500A GeneArray Scanner) detektiert werden. Anschließend erfolgten die grundlegenden bioinformatischen Auswertungen.

Für die hoch sensitive Detektion von spezifischen Sequenzen wird jedes Transkript auf dem *Microarray* durch einen Satz verschiedener Sonden (cDNA-Fragmente) repräsentiert. Die Sonden sind für einen Teil des Transkripts z.T. exakt sequenzspezifisch (*perfect match: PM*) und z.T. enthalten sie eine Punktmutation in der Mitte der entsprechenden Sequenz (*mismatch: MM*). Die *Microarray Suite 5.0* Software (MAS) berechnet anhand der Signalintensitäten zunächst die Differenz der PM- und der MM-Hybridisierungssignale. Die unspezifischen Bindungen werden also von den spezifischen abgezogen, um über die korrigierten Signale der hybridisierten RNA-Fragmente eines SONDENSETSES die korrekte Fluoreszenzintensität bzw. Hybridisierungseffizienz eines Gens zu ermitteln. Anschließend

stuft der MAS-Algorithmus, anhand statistischer Bewertungen, ein Transkript als exprimiert (*present: P*), schwach exprimiert (*marginal: M*) oder nicht exprimiert (*absent: A*) ein, dies ist der sogenannte *detection call*. Mit Hilfe der statistischen Expressionsalgorithmen von GCOS 1.4 (Gene Chip Operating Software) wurden die adenoviral transduzierten Proben auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen (*comparison analysis*). Gleichzeitig wurde der *change call* berechnet, der angibt, ob es zu einer Erhöhung (*increase: I*), zu einer Verminderung (*decrease: D*) oder zu keiner Veränderung (*no change: NC*) der Transkription kam. Zusätzlich wurde anhand weiterer Parameter, wie dem Unterschied der Expression einer Kontrolle mit einem Experiment, angegeben als \log_2 -Ratio (*Signal Log Ratio*), die Höhe der Expressionsänderung als Zahlenwert *Fold Change* berechnet. Die Darstellung der Expressionsdaten erfolgte als *Fold Change*, wobei Werte ≥ 2 bzw. ≤ -2 als signifikant differenziell exprimiert angesehen wurden. Nicht signifikante Werte wurden von der Software nicht angegeben und sind in den entsprechenden Tabellen dieser Arbeit mit „-“ gekennzeichnet.

Für die weitere bioinformatische Auswertung wurden das GeneSpring software package 6.1., Microsoft Access und Microsoft Excel genutzt. Für eine Zuordnung der identifizierten Gene, z.B. zu Signaltransduktionswegen oder miRNA-Targetgenen, erfolgte eine Auswertung durch die *Gene Set Enrichment Analysis* über die *Molecular Signature Data Base* [281].

Gene Set Enrichment Analysis

Bei der Auswertung von *Microarrays* werden Listen von teilweise tausenden Genen generiert, die differenziell exprimiert sind. Um herauszufinden, welche Regulationen wirklich von Bedeutung sind, geht die Analyse von Gengruppen der Suche nach einzelnen interessanten Genen voraus (*Gene Set Enrichment*-Verfahren). Bei dieser Verfahrensweise werden Gene mit funktionellen Gengruppen, z.B. Signalwegen, in Verbindung gebracht, um herauszufinden, in welchem biologischen Zusammenhang die selektierten Gene einer Versuchsbedingung stehen.

Um festzustellen, ob in derartigen Listen überproportional oft Gene enthalten sind, die einen bestimmten Signalweg angehören, wurde die *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)* Datenbank genutzt [282,283]. Es folgten *Gene Set Enrichment*-Analysen, um die unterschiedlich regulierten Gene weiteren funktionellen Gengruppen zuzuordnen, wie einem spezifischen 3'-UTR microRNA Bindemotiv [284].

Analyse von 3'-UTR microRNA Bindemotiven

Dazu erfolgte die Prüfung differenziell exprimierter Gene hinsichtlich 3'UTR-Bindemotive für microRNAs. Diese Analyse sollte der Identifizierung potentiell regulierter miRNA dienen. Der Nachweis der Regulation erfolgte nicht direkt über den Nachweis der miRNA, sondern indirekt über die Regulation möglicher Targetgene.

Ergab sich für eine Vielzahl von Targetgenen einer miRNA eine Hemmung oder Induktion, so wurde für die Auswertung angenommen, dass die miRNA selbst reguliert ist. Diese Annahme birgt jedoch

das Risiko, dass die Regulationen der Targetgene durch andere Mechanismen verursacht wurden bzw. aufgrund der fehlenden Wiederholung des *Microarray*-Experiments Artefakte darstellen. Die Vorhersage potentieller miRNA-Targets selbst, ist bereits nicht unproblematisch, da die Analyse der 3'UTR-Bindemotive z.T. tausend Zielgene ergeben kann. Um die prognostischen Algorithmen zu verbessern, werden von einigen Programmen zusätzliche Kriterien eingebaut, wie z.B. die Lokalisation der Bindesequenz in der Nähe des Stoppcodons bzw. von AU-reichen Bereichen [285].

3.2.12 Isolierung von Gesamtprotein

Für die Isolation von Gesamtprotein wurde die Zellkulturplatte auf Eis gestellt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit P38-Puffer versetzt. Das Zelllysat wurde mit dem Zellschaber vom Boden der Kulturschale abgelöst und die darin enthaltene DNA durch eine G18-Spritze geschert. Das Lysat wurde für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die im Überstand befindlichen Gesamtproteine bei -20 °C gelagert.

P38-Puffer

	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	1,2 mL	62,5 mM
SDS (10 %)	2,0 mL	2 %
Glycerol (100 %)	1,0 mL	10 %
DTT (1 M)	0,5 mL	50 mM
Nuklease freies Wasser	5,3 mL	

vorher: in 25 mL Wasser: ½ Complete (Protease-Inhibitor) Cocktail-Tablette lösen

3.2.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dazu wurden die Proteinproben 1:100 mit 0,9 % NaCl verdünnt. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe eingesetzt, deren Eichkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration der Proben genutzt wurde.

3.2.14 Western Blot-Analyse

Auftrennung und Transfer von Proteinen

100 µg Gesamtproteine wurden mit 2 x Laemmli-Puffer (Bio-Rad Laboratories) mit 2-β-Mercaptoethanol (1:20) versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis gestellt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [286] in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur in 1 x Laufpuffer (190 mM Glyzin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris-Base) zunächst für 30 min bei 60-70 V, danach bei 95 V bis die Bromphenolbande aus dem Trenngel gelaufen war.

12 % Trenngel		4 %-iges Sammelgel	
	<u>Volumen</u>		<u>Volumen</u>
Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	3,0 mL	Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	0,5 mL
10 % SDS	200 µL	10 % SDS	100 µL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL	0,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,25 mL
10 % APS	100 µL	10 % APS	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	10 µL
ddH ₂ O	4,3 mL	ddH ₂ O	3,2 mL

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtproteine wurde das Sammelgel verworfen. Trenngel, Nitrozellulosemembran, Chromatographiepapierstreifen, sowie Filterpad-Scheiben wurden in Transferpuffer (80 mM Glyzin, 20 % Methanol, 20 mM Tris-Base, pH 8,3) äquilibriert. Die Anordnung in der Tank-Blotting-Apparatur wurde nach Angaben des Herstellers aufgebaut. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 1 h bei 100 V.

Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemilumineszenz

Um den Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran zu kontrollieren, wurde diese für 3 min. in Ponceau-S-Färbelösung (0,2 % [w/v] Ponceau-S in 1 % [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Dabei bindet der Farbstoff reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und wird anschließend durch Bidest. abgewaschen.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden diese durch die Inkubation (2 h, RT bzw. üN, 4 °C) mit 5 % BSA/TBST (150 mM NaCl, 43 mM Tris-HCl, 7 mM Tris-Base, 0,1 % Tween® 20, pH 7,4-7,6) bzw. 5 % Magermilchpulver/TBST geblockt. Infolgedessen binden die Anti-

körper für den spezifischen Nachweis von Proteinen nur an ihr spezifisches Epitop. Dazu wurde die Membran mit einer verdünnten Primärantikörperlösung (Tab. 5) behandelt (2 h, RT bzw. üN, 4 °C). Anschließende Waschschrte (3 x 10 min mit TBST) entfernen schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Durch die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper (Tab. 5) (1 h, RT) kann dieser an den Primärantikörper binden. Diese Antikörperbindung kann nach weiteren Waschschrten (3 x 10 min mit TBST, 1 x TBS) mittels Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden. Dazu wurde SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio Science) verwendet. Die Exposition der Blots erfolgte auf Hyperfilm ECL.

Tab. 5: Auflistung der für den Western Blot eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Größe	Verdünnung	TBST mit
Primärantikörper			
Phospho-SMAD2 (Ser465/467) (138D4), <i>rabbit mAb</i>	60 kDa	1:1.000	5 % BSA
SMAD2 (86F7), <i>rabbit mAb</i>	60 kDa	1:1.000	5 % Magermilch
Phospho-SMAD3 (Ser423/425), <i>rabbit mAb</i>	52 kDa	1:1.000	5 % BSA
SMAD3 (C67H9), <i>rabbit mAb</i>	52 kDa	1:1.000	5 % Magermilch
Phospho-β-Catenin, <i>rabbit mAb</i>	92 kDa	1:1.000	5 % BSA
β-Catenin (6B3), <i>rabbit mAb</i>	92 kDa	1:1.000	5 % BSA
Ms X Actin, <i>Mouse anti-actin mAb</i>	45 kDa	1:5.000	5 % Magermilch
Sekundärantikörper			
<i>Anti-rabbit</i> IgG, Peroxidase konjugiert		1:2.000	5 % Magermilch
<i>Goat anti-Mouse</i> IgG, (H+L), Peroxidase konjugiert		1:10.000	5 % Magermilch

Für eine erneute Antikörperinkubation eines Blots wurden die gebunden Antikörper mittels Western Blot Recycling Kit (Alpha Diagnostic) nach den Angaben des Herstellers entfernt bzw. für 15 min. mit Natrium-Citratpuffer (100 mM, pH 2,2) behandelt.

3.2.15 Sekretionsassay mittels ELISA-Technik

Die Gliomzellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten mit den adenoviralen Vektoren transduziert (Kapitel 3.3.3). 24 h nach der Transduktion wurde das Kulturmedium abgenommen und gegen DMEM mit 4 mM Glutamin und 1 % FKS ausgetauscht. Dies war nötig, um die in dem verwendeten FKS enthaltenen nachweisbaren Mengen der sekretierten Proteine möglichst gering zu halten. Nach weiteren 48 h Kultivierung erfolgte die Abnahme und Lagerung von drei Aliquots Zellkulturüberstand pro Well und dessen Lagerung bei -20 °C. Später erfolgte die Bestimmung von VEGF, TGF- β 1 und TGF- β 2 pro Well mit den drei Aliquots des Zellkulturüberstandes.

ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)

Die Konzentration von sekretiertem VEGF, TGF- β 1 und TGF- β 2 wurden mit dem jeweiligen Quantikine® Kit (R&D Systems) nach den Angaben des Herstellers auf Grundlage eines *Sandwich-Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Nach dem Auftauen der Aliquots erfolgte eine Zentrifugation, um eventuell vorhandene Partikel oder Zellen, die den Nachweis stören würden, abzutrennen.

Die Messung der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm gegen 570 nm (Referenzwert) am SmartSpec™ Plus Spectrophotometer.

Sulforhodamin B-Färbung

Der Sulforhodamin B (SRB)-Test bietet die Möglichkeit behandelte und unbehandelte Zellen hinsichtlich ihrer Zellzahl zu vergleichen, da diese über einen großen Bereich mit der durch den Farbstoff angefärbte Proteinmenge korreliert [287,288].

Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen in 10 %-iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4 °C fixiert und anschließend fünfmal mit Wasser gewaschen. Die Färbung der Proteine erfolgte mittels SRB-Lösung (0,4 % Sulforhodamin B in 1 % Essigsäure) für 10 min, wobei die überschüssige Färbelösung anschließend durch fünfmaliges Waschen mit 1 %-iger Essigsäure entfernt wurde. Die Kulturplatten wurden bei RT getrocknet. Die Lösung der Protein-SRB-Komplexe fand durch Zugabe von 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) statt. Die Farbintensität wurde bei 562 nm gegen 690 nm (Referenzwellenlänge) am SmartSpec™ Plus Spectrophotometer bestimmt.

Auswertung

Um Ausschließen zu können, dass die veränderte Sekretion der transduzierten Zellen nicht auf eine virale Lyse, und somit verringerte Zellzahl, der Gliomzellen zurückzuführen ist, sondern aufgrund des viralen Einflusses auf die zellulären Signaltransduktionswege, wurden nur geringe Virustiter eingesetzt und zusätzlich die sekretierte Proteinmenge auf die SRB-Färbung normalisiert.

3.2.16 Reporter-Assay

Nach der Aktivierung des TGF- β -Signalwegs bilden die Transkriptionsfaktoren SMAD2 und SMAD3 einen Komplex mit SMAD4 und wandern zum Zellkern, wo sie die Expression von TGF- β -sensitiven Genen anregen.

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann als Indikator für den intrazellulären Zustand des entsprechenden Signalwegs herangezogen werden. Diese Messung wurde mit Hilfe des Signal™ Reporter Assay (SABiosciences) durchgeführt. Dabei können Steigerungen und Abnahmen in der Aktivität des Signalwegs bestimmt werden. Hierfür wurde ein Plasmid verwendet bei dem das Reportergen (*Firefly Luciferase*) unter der Kontrolle eines basalen Promotorelements (TATA-Box) und eines minimalen CMV-Promotor ist, die wiederum gekoppelt sind mit einer sich wiederholenden Sequenz von TGF- β -spezifischen SMAD transkriptionalen *Response*-Elementen (für SMAD2, SMAD3, SMAD4). Zusätzlich enthält jedes Plasmidgemisch ein *Renilla*-Konstrukt. Die *Renilla* Luciferase unterliegt der Kontrolle eines CMV-Promotors der konstitutiv das Protein exprimiert (Abb. 6). Dadurch lässt sich die *Renilla*-Biolumineszenz als interne Kontrolle für die Normalisierung der Transfektionseffizienz und des zellulären Überlebens heranziehen. Die Negativkontrolle ist wichtig für die Identifizierung spezifischer Effekte und zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des Reporterproteins.

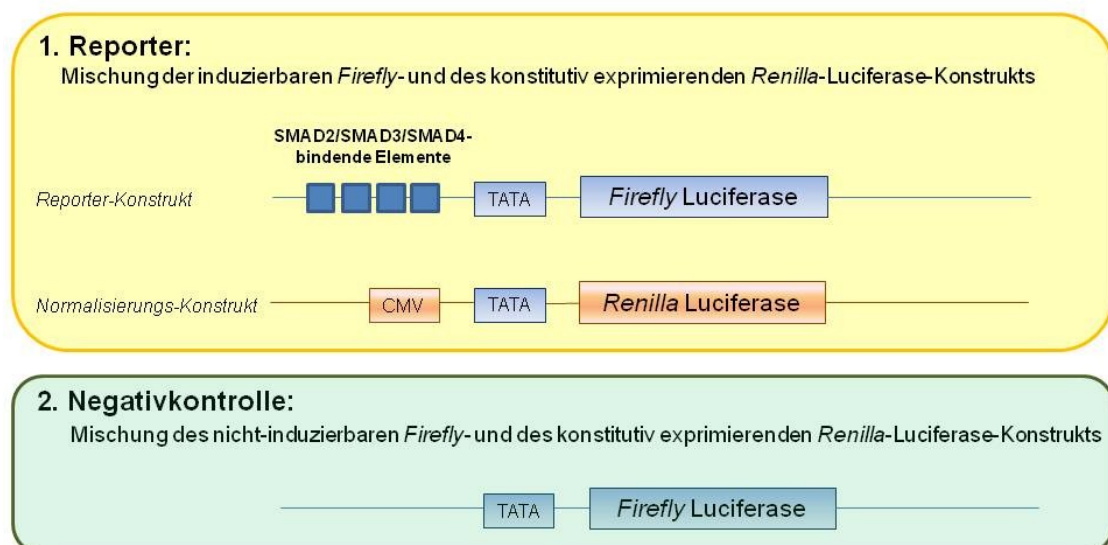


Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstrukte des Signal™ Reporter Assays [289].

Luciferasen sind Enzyme, die Luciferin mit Sauerstoff zu energiereichen Substanzen oxidieren können. Bei deren Zerfall kommt es zur Emittierung von Licht (Biolumineszenz). Am bekanntesten sind die aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammende *Firefly* Luciferase (Emissionsmaximum = 537 nm) und die aus der Seefedernart *Renilla reniformis* stammende *Renilla* Luciferase (Emissionsmaximum = 435 nm) [290].

Die Gliomzellen wurden in 6-Well-Mikrotiterplatten mit den adenoviralen Vektoren transduziert (Kapitel 3.3.3). Zusätzlich wurde in den Zellen kontinuierlich der TGF- β -Signalweg durch die Zugabe von 0,3 ng/mL TGF- β 1 oder - β 2 (R&D Systems) aktiviert. 24 h nach der Transduktion wurden die Zellen trypsinisiert und in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 15.000 Zellen pro Well und 8 Well pro Probe ausgesät. Nach etwa 16 h erfolgte die Transfektion von jeweils 4 Well pro Probe mit dem Reporter bzw. der Negativkontrolle mittels SureFECT™ Transfektions Reagenz nach Angaben des Herstellers. 24 h nach der Transfektion und 72 h nach der Infektion wurden die Zellen vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Die Ernte der Zellen und die Biolumineszenzmessung erfolgte mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega GmbH) nach Angaben des Herstellers. Das Lysat wurde bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Auswertung

Die Messung der Reporter-Luciferase (*Firefly*) ist von der Regulation des Signalweges abhängig, jedoch auch von der Transfektionseffizienz und der Zellzahl. Diese können sich jedoch in behandelten und unbehandelten Proben unterscheiden. Die *Firefly*-Messung muss also auf einen nicht regulierbaren (induzierbaren), konstitutiv exprimierten Referenzreporter (*Renilla*) normalisiert werden.

Um die Hintergrundaktivität der Luciferasen zu eliminieren und damit spezifische Regulationen des Signalwegs sichtbar zu machen, wurden anschließend für jede Probe die normalisierten Werte für die Transfektion mit dem Reporterkonstrukt bezogen auf die normalisierten Werte der Transfektion mit der Negativkontrolle:

$$\frac{\text{Probe1}_{\text{transfiziert mit Reporter}} \left(\frac{\text{Firefly}}{\text{Renilla}} \right)}{\text{Probe1}_{\text{transfiziert mit Negativkontrolle}} \left(\frac{\text{Firefly}}{\text{Renilla}} \right)}$$

3.3 Adenovirale Methoden

3.3.1 Herstellung aufgereinigter hochkonzentrierter Virusstammlösungen

Sechzehn 25 mm-Schalen mit subkonfluent gewachsenen HEK-293A-Zellen wurden mit rekombinanten Adenoviren infiziert, und nach Sichtbarwerden des viral bedingten zytopathischen Effekts (*cytopathic effect*, CPE) abgespült, zentrifugiert (15 min, 3.000 rpm) und das Zellpellet in 20 μ M Tris-Base, 25 μ M NaCl, 2,5 % Glycerol bei -80 °C gelagert.

Die rekombinanten Viren wurde durch mindestens dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196 °C) und Auftauen im Wasserbad (37 °C) aus den HEK-293A Zellen freigesetzt (*thaw and freeze*). Die Zelltrümmer wurden pelletiert (15 min, 3.000 rpm) und der virushaltige Überstand über einen Cäsium-Chlorid-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurden 10 mL CsCl-Lösung (Dichte 1,45 g/m³) mit 16 mL CsCl-Lösung (Dichte 1,33 g/m³) überschichtet, anschließend erfolgte der Auftrag des Virusüberstandes. Die Zentrifugation fand für 4 h bei 28.000 rpm und 14 °C (LE80K-Ultrazentrifuge) statt.

Die Adenoviruspartikel mit einer Dichte von $1,34 \text{ g/m}^3$ sammelten sich in einer scharfen Bande zwischen den CsCl-Schichten.

Unter Beachtung der S2-Sicherheitsvorkehrungen wurde die Adenovirusbande mit einer 18G-Kanüle und 2 ml-Spritze aus dem Ultrazentrifugenröhrchen abgezogen und die hochkonzentrierte virale Lösung in Dialyse-Kassetten gegen 10 mM Tris-HCl (pH 7,6-7,8) dialysiert. Dabei wird das CsCl mit Hilfe einer semipermeablen Membran entfernt. Um ein Ausfällen des CsCl zu vermeiden, erfolgte die erste Dialyse für 2 h bei RT, anschließend bei 4°C , insgesamt wurde das Dialysat dreimal erneuert. Nach 24-stündiger Dialyse wurde die Viruslösung aus der Dialyskassette mit einer 18G-Kanüle und 2 mL-Spritze abgezogen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die erreichbaren Viruskonzentrationen mit dieser Methode liegen in unserem Labor im Bereich von 10^9 bis 10^{11} pfu/mL.

3.3.2 Bestimmung des Virustiter

Unter dem Titer versteht man die quantitative Messung der biologischen Aktivität von Viren, welche in der Maßeinheit *plaque forming units* (pfu) pro Milliliter (mL) angegeben wird.

Der Titer der viralen Vektoren wurde mittels AdEasy™ Viral Titer Kit (Stratagene) nach einem auf dem ELISA-Prinzip bestehenden Protokoll bestimmt [291]. Dabei bindet der Primärantikörper das adenovirale Kapsid-Protein Hexon und wird wiederum von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe eines entsprechenden Substrates die Farbreaktion, wodurch es zur Anfärbung der infizierten Zellen kommt. Über eine Verdünnungsreihe kann die Konzentration der Virus-Stocklösung berechnet werden, wobei die infektiösen Einheiten den *plaque forming units* (pfu) entsprechen:

$$\text{Infektiöse Einheiten (IFU)}_{\text{mL}} = \frac{\text{Mittelwert} \left(\frac{\text{positive Zellen}}{\text{Sichtfeld}} \right) \times \text{Sichtfelder}_{\text{Well}}}{\text{Volumen des verdünnten Virus} \left(\frac{\text{mL}}{\text{Well}} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Für eine möglichst genaue Titerbestimmung wurde der Virusstock zwei- bis dreimal durch verschiedene Experimentatoren getitert. Die Titerwerte wurden anschließend gemittelt.

3.3.3 Adenovirale Transduktion von Gliomzellen

500.000 Gliomzellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 16 h wurden die Zellen mit adenoviralen Vektoren und verschieden hohen *multiplicities of infection* (MOI) transduziert. Der MOI-Wert beschreibt das Verhältnis der Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Zielzellen zum Zeitpunkt der Transduktion.

Die Transduktion wurde für 1 h in Opti-MEM (Invitrogen GmbH) bei 37 °C / 5 % CO₂ durchgeführt, wobei die Zellkulturplatte alle 15 min geschwenkt wurde. Anschließend wurde das Transduktionsgemisch abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt.

Bei der Wiederholung von Versuchen mit adenoviraler Transduktion wurden verschiedene Virusstocklösungen verwendet. Durch dieses Vorgehen sollte die Wahrscheinlichkeit, dass ein nicht korrekt bestimmter Titer die Ergebnisse verfälscht, minimiert werden.

3.4 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden jeweils im zwei- bis dreifachen Ansatz durchgeführt und mindestens zwei- bis dreimal wiederholt. Die Ergebnisse der Versuche wurden als arithmetischer Mittelwert mit der Standardabweichung angegeben. Für die Darstellung der Sekretions- und Reporterassays wurden die unbehandelten Kontrollen auf 100 % gesetzt und die jeweiligen Bedingungen auf die Kontrollen bezogen. Auf diese Weise wurden die biologischen Schwankungen zwischen den unabhängigen Experimenten und unterschiedliche Level zwischen den verwendeten Zelllinien normalisiert.

Die Signifikanzen wurden mit einem zweiseitig gepaarten *student's* t-Test durch die Excel-Software berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Viren und ihrer Replikationskompetenz bzw. -inkompetenz

4.1.1 Überprüfung des viralen E1-Status durch PCR

Die selbst vermehrten, aufgereinigten und titrierten Viren Ad5-wt, Ad5-Ad312 ($\Delta E1A$) und Ad5-Delo3RGD ($\Delta E1-13S$) zeigten unterschiedliche bzw. keine Deletionen in der *E1A*-Region ihres Genoms auf. Das Vorhandensein dieser Deletion bedingt in den meisten Zellen eine Unfähigkeit der Replikation nach Transduktion. Für die Vermehrung eines Virusstock ist es deshalb essentiell eine *E1*-komplementierte Zelllinie, wie HEK-293A, zu verwenden, welche die *E1*-Proteine in *trans* bereitstellt und infolgedessen einen vollständigen Replikationszyklus von replikationsinkompetenten Vektoren, inkl. Zellyse, ermöglicht [89].

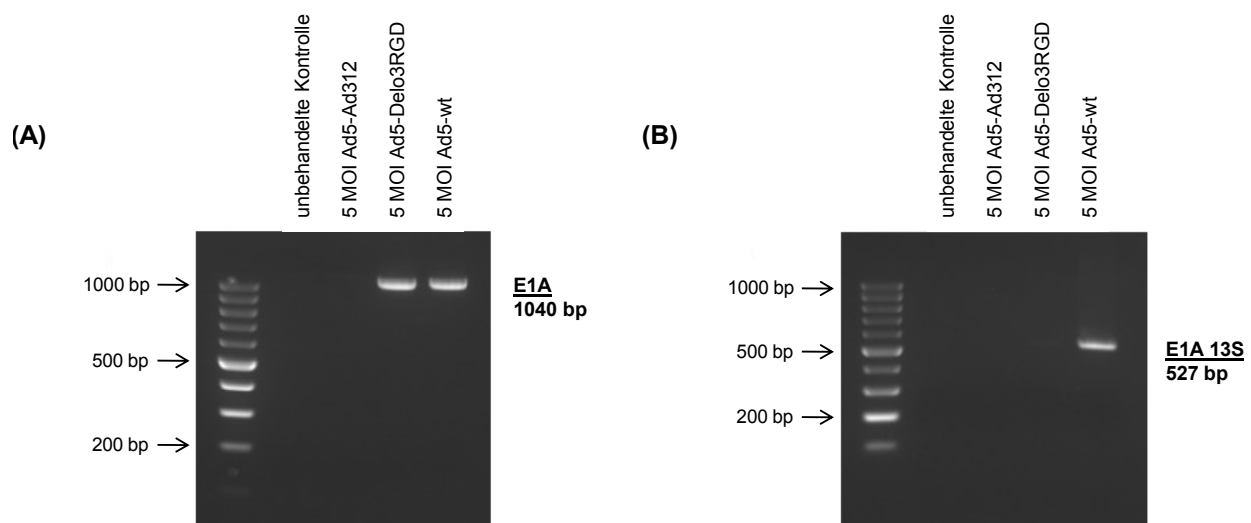


Abb. 7: Nachweis der *E1A*-Deletion von Ad5-312, bzw. der *E1A*-13S-Deletion von Ad5-Delo3RGD im Vergleich zum Ad5-wt.

Zur Bestimmung des *E1A*-Status, und damit zur Fähigkeit der adenoviralen Replikation, wurde eine PCR mit genom-spezifischen Primern für die Regionen *E1A* bzw. *E1A*-13S durchgeführt. Die Isolation des Probenmaterials fand 72 h nach Transduktion in U373-MG mit den aufgeführten Vektoren statt.

Nach Denaturierung der Adenoviren mittels PCR und unter Verwendung entsprechend spezifischer Primer (Tab. 3) erfolgte die Bestätigung, dass es bei der Vermehrung der Viren zu keiner Kreuzkontamination der Vektoren kam. Als Positivkontrolle wurde A5-wt verwendet. Ebenfalls kann ausgeschlossen werden, dass replikationskompetente Revertanten entstanden sind. Dies ist möglich durch

eine homologe Rekombination zwischen überlappenden Regionen der viralen Sequenzen der deletierten Viren Ad5-Ad312 bzw. Ad5-Delo3RGD und der Zelllinie HEK-293A [292].

Abb. 7 zeigt exemplarisch in U373-MG, stellvertretend für alle vier verwendeten Gliomzelllinien, den Nachweis der *E1A*-Deletion in Ad5-Ad312 sowie der *E1A-13S*-Deletion in Ad5-Delo3RGD, im Vergleich zum nicht deletierten Ad5-wt. Damit sind die in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren mit *E1A*-Deletionen replikationsinkompetent. Anhand der unbehandelten Kontrolle konnte gezeigt werden, dass während der Durchführung der Experimente sorgfältig gearbeitet wurde. Die Kontrollen der Versuche wiesen keine Kontaminationen mit den verwendeten Vektoren auf und geben somit in den folgenden Experimenten Aufschluss über die physiologische Expression der untersuchten Gene bzw. Proteine ohne den Einfluss von viralen Regulationen.

4.1.2 Darstellung der Adenovirus DNA-Replikation

Für den Nachweis der adenoviralen Replikation in Gliomzellen wurde 72 h nach Infektion (5 MOI) die genomische DNA aus den Zellen, und damit auch die DNA der transduzierten Vektoren, isoliert (Kapitel 3.2.1). Anschließend erfolgte die Southern Blot-Analyse (Kapitel 3.2.4), bei der die Bindung der 1.502 bp lange *E2Late*-Sonde an die virale DNA Auskunft über die Replikation gibt. Als Positivkontrolle wurde Ad5-wt und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen verwendet. Abb. 8 (A) zeigt exemplarisch, anhand der Gliomzelllinie U373-MG, das Replikationsmuster der in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren in Glioblastomzellen.

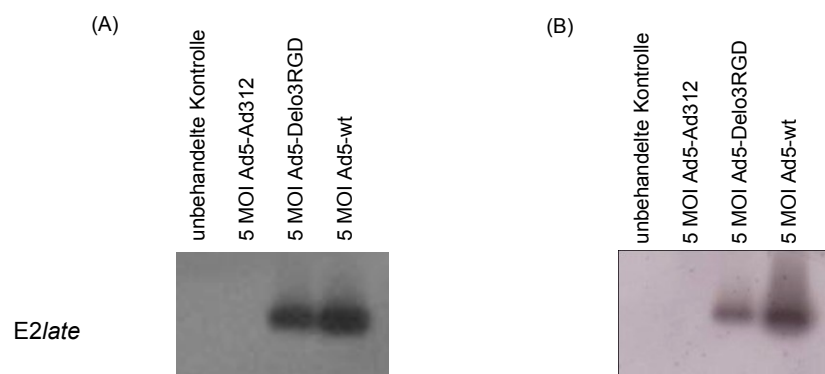


Abb. 8: Adenovirale DNA-Replikation von Ad5-wt, sowie Ad5-Delo3RGD, jedoch nicht von der *E1A*-Deletante Ad5-312, in Glioblastomzelllinien.

72 h nach adenoviraler Transduktion von U-373MG (A) bzw. LN-229 (B) mit Ad5-Ad312 ($\Delta E1A$), Ad5-Delo3RGD ($\Delta E1-13S$) bzw. Ad5-wt wurde die genomischen DNA einer Southern Blot-Analyse zugeführt. Der Nachweis der Replikation erfolgte über eine radioaktiv-markierte *E2Late*-Sonde.

In der Zelllinie LN-299 konnte sich Ad5-Delo3RGD nicht ebenso gut replizieren wie das Wildtypvirus (Abb. 8 (B)). Diese Resultate bestätigten die Ergebnisse von Holzmüller *et al.* [216].

Der replikationskompetente Wildtyp (Ad5-wt) und das replikationsinkompetente bzw. bedingt replikationskompetente Ad5-Delo3RGD ($\Delta E1A-13S$) konnten sich in Glioblastomzellen replizieren im Gegensatz zur *E1A*-Deletante Ad5-Ad312.

4.2 Microarray-Analyse

Um die genauen Auswirkungen und Regulationen der adenoviralen Transduktion des bedingt replikationskompetenten onkolytischen Virus Ad5-Delo3RGD auf Glioblastomzellen zu untersuchen, wurde die Möglichkeit genutzt mittels *Gene Chip*® Genome U133 Plus 2.0 Arrays die Aktivität von 14.500 Genen gleichzeitig zu messen. Parallel sollte das durch Ad5-Delo3RGD hervorgerufene Expressionsprofil mit dem der replikationsinkompetenten *E1A*-Deletante (Ad5-Ad312) und dem des replikationskompetenten Wildtypvirus verglichen werden. Als Kontrolle wurde die Aktivität der Gene in unbehandelten Zellen herangezogen.

Zu diesem Zweck wurden drei Gliomzelllinien, LN-18, U373-MG und U-87MG, mit 10 MOI des Ad5-wt, Ad5-Ad312 bzw. Ad5-Delo3RGD infiziert. Nach 48 h wurde die RNA von Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD transduzierten Zellen isoliert, nach 72 h von Ad5-Ad312 transduzierten bzw. unbehandelten Zellen. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Hybridisierung der Proben auf die *Gene Chip*® *Microarrays* und deren Auswertung (Kapitel 3.2.11).

Der Versuch erfolgte einmalig.

4.2.1 Globale Expressionsanalysen von adenoviral transduzierten Gliomzellen

Mit Hilfe des GeneSpring software package 6.1. wurde ein Verzeichnisbaum (*Tree*, bzw. Dendrogramm) der Genexpression erstellt (Abb. 9). Somit kann die Ähnlichkeit von Expressionsprofilen unterschiedlicher Versuchsbedingungen durch ihre Anordnung und die farbliche Markierung der Datensätze illustriert werden. Um besser allgemeine Vergleiche über Genregulationen treffen zu können, wurden die Experimente zuerst entsprechend der verwendeten Zelllinie und anschließend gemäß der Behandlung angeordnet.

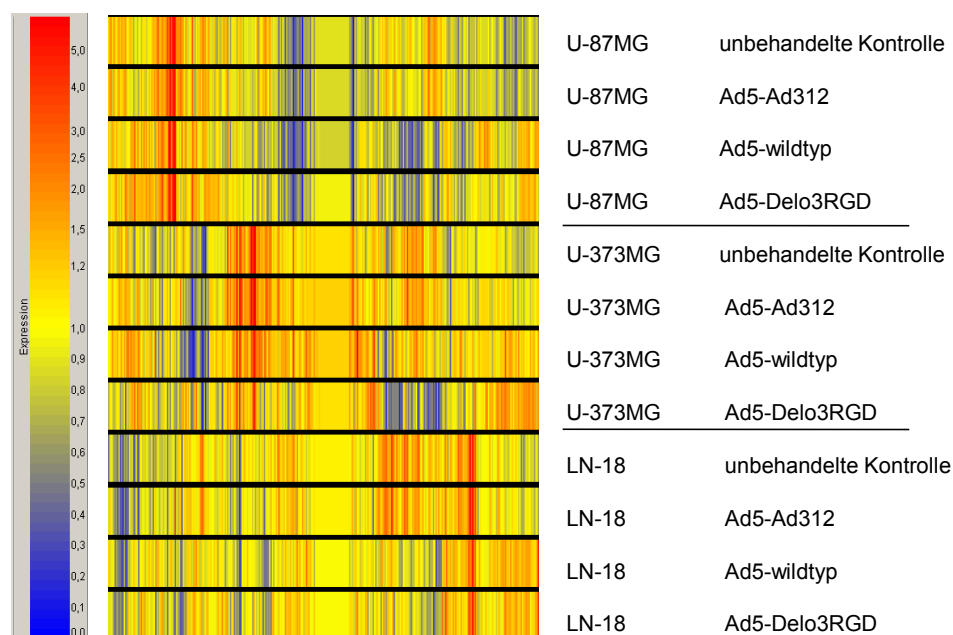


Abb. 9: Genexpression-Verzeichnisbaum für alle Sonden des *Microarrays* HG-U133 A 2.0.

Dargestellt ist die normalisierte Expression aller 22.000 SONDENSSETS der Gliomzelllinien U-87MG, U-373MG und LN-18 nach 48 h (Ad5-Delo3RGD, Ad5-wt) bzw. 72 h (Ad5-Ad312, unbehandelte Kontrolle) viraler Transduktion mit dem angegebenen Vektor (10 MOI). Blau beschreibt eine niedrige, gelb eine mittlere und rot eine hohe Expression.

Bei Betrachtung des Dendrogramms (Abb. 9) ließen sich generell Unterschiede in den Genexpressionsprofilen der verschiedenen Versuchsbedingungen erkennen. So wiesen bereits die unbehandelten Kontrollen der verwendeten Zelllinien andersgeartete Muster in der Expression der untersuchten Transkripte auf. Trotz der Zugehörigkeit zur gleichen Tumorentität, dem Glioblastom, unterschieden sich LN-18, U-373MG und U-87MG in der molekulargenetischen Ausprägung der begutachteten Gene. Lediglich geringe bis geringste Abweichungen konnten hingegen bei der Gegenüberstellung der unbehandelten Kontrolle einer Zelllinie mit den Ad5-Ad312 transduzierten Zellen festgestellt werden.

Schnittmengenanalysen

Die Schnittmengenanalyse sollte zeigen, wie stark der Einfluss von Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312 auf Gliomzellen ist. Die Berechnung erfolgte mittels des GeneSpring software package 6.1. unter zwei Gesichtspunkten. Erstens sollte die Menge der, in allen Zelllinien gleichzeitig, regulierten Gene durch einen spezifischen Vektor ermittelt werden (Tab. 6). Das erlaubte eine Aussage, über die allgemeine Wirkung dieses Vektors auf Gliomzellen und nicht speziell für eine bestimmte Zelllinie. Zweitens wurde die Anzahl der gemeinsam oder separat differenziell exprimierten Gene mittels

adenoviraler Vektoren in einer Zelllinie kalkuliert (Abb. 10). Auf diese Weise ließ sich abschätzen, in wieweit die Regulationen der verwendeten Adenoviren die gleichen zelluläre Faktoren betreffen.

Für den Ausschluss von nicht aussagekräftigen Regulationen, wurden nur Gene mit einem *Fold Change* ≥ 2 bzw. ≤ -2 in die biostatistischen Auswertungen eingeschlossen.

Tab. 6: Schnittmengeberechnungen zum Einfluss adenoviraler Vektoren auf gemeinsame zelluläre Faktoren der Gliomzelllinien LN-18, U-373MG und U-87MG

	Anzahl differenziell exprimierter Gene ¹			
	<i>reduzierte Expression</i>		<i>erhöhte Expression</i>	
	insgesamt ²	in mehr als zwei Zelllinien gemeinsam ³	insgesamt ²	in mehr als zwei Zelllinien gemeinsam ³
Ad5-wt	3.746	593	2.126	181
Ad5-Delo3RGD	3.096	232	2.302	138
Ad5-Ad312	392	2	266	0

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene waren mindestens um den Faktor 2 im Vergleich von adenoviral transduzierten zu unbehandelten Zellen reguliert, d.h. der *Fold Change* war ≥ 2 bzw. ≤ -2 .

⁽²⁾ Die Anzahl der Gene, die in einer, in zwei oder in allen drei verwendeten Gliomzelllinien (LN-18, U-373MG, U-87MG), nach Transduktion mit dem entsprechenden Adenovirus differenziell exprimierten wurden.

⁽³⁾ Die Anzahl der Gene, die gleichzeitig in mindestens zwei der drei verwendeten Gliomzelllinien (LN-18, U-373MG, U-87MG), nach der Transduktion mit dem entsprechenden Adenovirus, differenziell exprimiert wurden.

Aus Tab. 6 lässt sich entnehmen wie groß die Wirkung der in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren auf Gliomzellen im Allgemeinen ist. Die replikationskompetenten bzw. bedingt -kompetenten Vektoren regulierten die Expression von über 5.000 Genen in LN-18, U-373MG, sowie U-87MG. Die Mehrheit dieser Gene (ca. 60 %) wurde dabei in ihrer Expression gehemmt. Von dieser großen Anzahl an differenziell exprimierten Genen wurden lediglich 8,5 % (181 Gene) positiv bzw. 15,8 % (593 Gene) negativ von Ad5-wt in allen Zelllinien reguliert. Dies entsprach dem generellen Einfluss des Wildtypvirus auf Gliomzellen. Das onkolytische Ad5-Delo3RGD hatte in Glioblastomzellen im Allgemeinen eine Wirkung auf 370 Gene, davon wurden 138 Gene (6 %) verstärkt und 232 Gene (7,5 %) reduziert exprimiert. Dieser prinzipielle Einfluss beider Vektoren war in etwa gleich groß. Im Unterschied dazu induzierte die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 eine differenzielle Expression von lediglich 500 Genen.

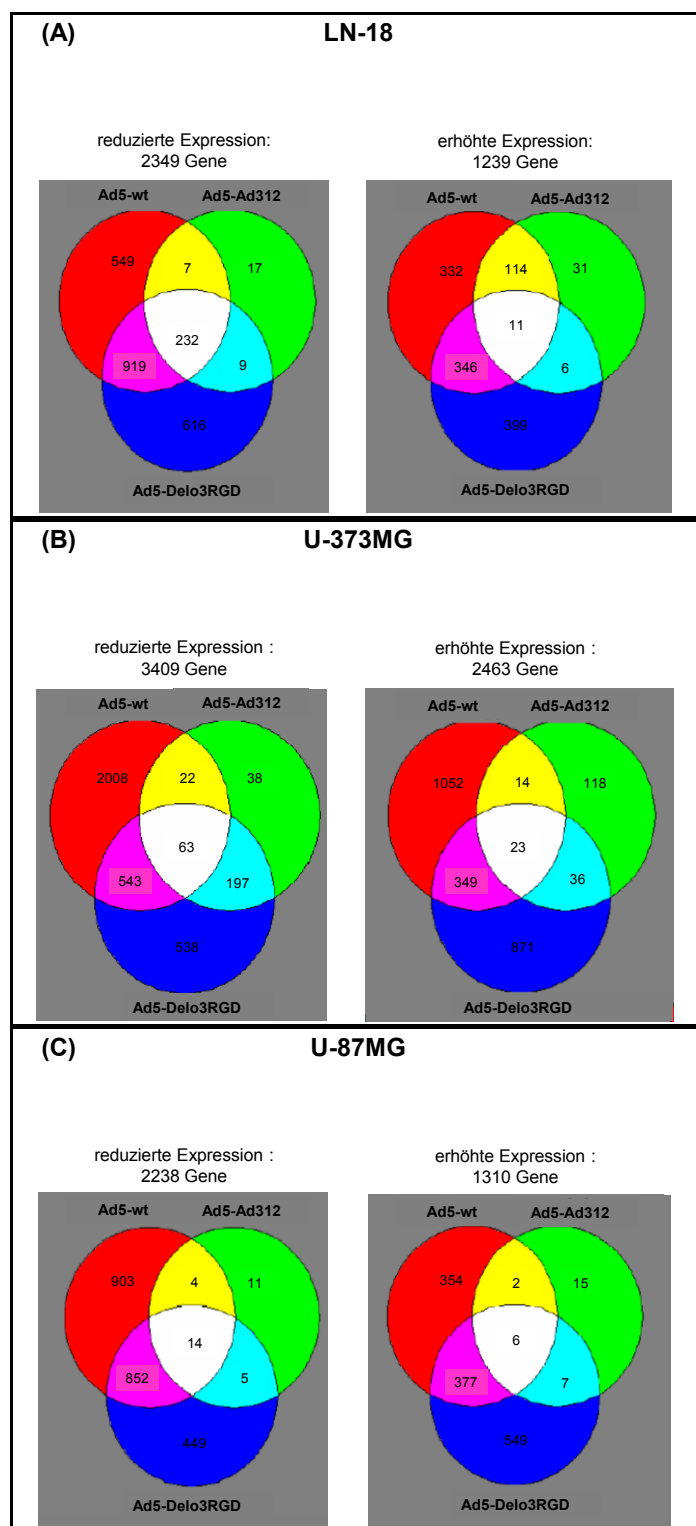


Abb. 10: Schnittmengendiagramme zum gemeinsamen Einfluss adenoviraler Vektoren aufgeschlüsselt nach Zelllinien.

Graphisch dargestellt ist die Schnittmengenanalyse für die Zelllinien LN-18 (A), U-373MG (B) und U-87MG (C). Dabei ist die Anzahl der gemeinsam bzw. exklusiv in einer Zelllinie differenziell regulierten Gene nach Behandlung (10 MOI) mit dem replikationsinkompetenten Ad5-Ad312 für 72 h bzw. den replikationskompetenten Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD für 48 h dargestellt.

Um abzuschätzen, ob sich die regulative Wirkungen des onkolytischen Ad5-Delo3RGD-Virus und des replikationskompetenten Wildtypvirus auf die gleichen zellulären Faktoren auswirkte, und in wieweit die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 daran beteiligt war, wurde die Anzahl der gemeinsam oder separat differenziell exprimierten Gene je Zelllinie ermittelt (Abb. 10). Dabei zeigte sich, dass nur wenige Gene einer Zelllinie durch alle drei verwendeten Vektoren gemeinsam reguliert wurden. Diese Schnittmengen entsprachen weniger als 2 % der Gesamtheit der regulierten Gene einer Zelllinie, mit Ausnahme von LN-18 (~ 10 %). Verursacht wurde dieser Umstand aufgrund der insgesamt geringe Menge an regulierten Genen durch Ad5-Ad312 (siehe oben, Tab. 6). Jedoch wiesen Ad5-wt und das bedingt replikationskompetente Ad5-Delo3RGD größere Schnittmengen gemeinsam regulierter Gene auf. 30 % der positiv und 40-50 % der negativ regulierten Genen in LN-18 und U-87MG konnten durch beide Vektoren beeinflusst werden. Wohingegen in der Gliomzelllinie U-373MG weniger Gene gemeinsam durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD positiv (20 %) bzw. negativ (30 %) reguliert wurden.

4.2.2 KEGG-Signalweg bezogene Auswertung der *Microarray*-Ergebnisse

Die Schnittmengenanalysen resultierten in Listen mit differenziell regulierten Genen, die z.T. mehrere hundert oder tausend Gene umfassten (Abb. 10, Tab. 6). Ziel war es nun den Einfluss des *E1A*-13S deletierten Ad5-Delo3RGDs auf Gliomzellen genau charakterisieren zu können. Desweiteren sollte verglichen werden, ob dieselben zellulären Faktoren und Signalwege ebenfalls durch das Wildtypvirus und die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 reguliert werden.

Aufgrund des Bestrebens der Identifikation von Regulationen, die wirklich von Bedeutung sind und trotz der unterschiedlichen Isolationszeitpunkte der untersuchten Proben, ging die Analyse von Gengruppen (*Gene Set Enrichment*) der Suche nach einzelnen interessanten Genen voraus. Dazu wurden die Listen der differenziell exprimierten Gene einer *KEGG*-Analyse unterzogen und überprüft, ob überproportional viele Gene einem bestimmten Signalweg angehörten (Tab. 7). Dabei wurden, wenn möglich, jedem Gen ein oder mehrere Signalwege zugeordnet. Zusätzlich wurde für jeden Signalweg nicht nur die absolute Anzahl der assoziierten Gene, sondern auch ein Signifikanzwert angegeben. Diese Signifikanz errechnete sich aus der Anzahl der regulierten Gene und der auf dem *Microarray* repräsentierten Gene für diesen Signalweg. Für die weitere Auswertung und Identifikation von Signaltransduktionswegen wurde lediglich die absolute Zahl an differenziell regulierten Genen betrachtet, da in Kategorien mit insgesamt nur wenigen Einträgen sich automatisch hohe Signifikanzen ergaben, wohingegen bei einer großen Zahl an Einträgen nicht signifikante Aussagen getroffen wurden. Ein weiteres Kriterium für die Erstellung der Signalweg-Listen war, dass ein Gen in mindestens zwei der drei verwendeten Gliomzelllinien in gleicher Weise durch einen adenoviralen Vektor differenziell reguliert wurde.

Tab. 7: Signifikant regulierte Signaltransduktionswege, geordnet nach Anzahl differenziell exprimierter Gene

Signalweg	ausführliche Genliste	Anzahl differenziell exprimierter Gene ¹		
		<i>Ad5-wt</i>	<i>Ad5-Delo3RGD</i>	<i>Ad5-Ad312</i>
Wnt- Signalweg	Tab. 17	22	20	0
Apoptose	Tab. 16	20	15	2
E2F	Tab. 15	19	9	0
TGF- β -Signalweg	Tab. 18	13	13	0

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene hatten einen *Fold Change* von ≥ 2 bzw. ≤ -2 und waren in mindestens zwei der drei untersuchten Gliomzelllinien in gleicher Weise reguliert.

Während der Auswertung der *KEGG*-Analyse wurde u.a. auf Signalwege und Faktoren geachtet, die bekannt dafür sind, dass Adenoviren darauf Einfluss nehmen, um die Zelle für eine optimale Virusreplikation umzuprogrammieren. Deshalb war es wenig überraschend, dass sich unter den Kategorien, die eine besonders gehäufte differenzielle Regulation durch das Wildtypvirus und das bedingt replikationskompetente *Ad5-Delo3RGD* aufwiesen, Apoptose-Signalwege, sowie E2F-Faktoren und ihre Targetgene (Tab. 7) befanden. Wohingegen das *Ad5-Ad312*, wegen seiner *E1A*-Deletion und daraus folgend seiner Replikationsinkompetenz, keinen Einfluss darauf nahm. Die höchste Anzahl an regulierten Genen in Gliomzellen nach Transduktion mit *Ad5-wt* (22 Gene) oder *Ad5-Delo3RGD* (20 Gene) hatte der Wnt-Signalweg. Eine weitere Kategorie, die eine auffällig konzentrierte differenzielle Expression von Genen aufwies, war der TGF- β -Signalweg. Sowohl das Wildtypvirus, als auch das onkolytische *Ad5-Delo3RGD* regulierten 13 Gene, die mit diesem Signalweg assoziiert sind.

4.2.2.1 E2F-Targetgene

Für eine optimale Replikation des viralen Genoms modulieren Adenoviren den Stoffwechsel der Wirtszelle und drängen diesen in die S-Phase. Der adenovirale *E2Early* Promotor benötigt E2F für eine effiziente Expression [262]. Das *E1A*-Protein enthält in seiner CR2-Region eine Bindungsstelle für Rb-Proteine. Durch die Bindung von Rb wird E2F freigesetzt und kann die Transkription seiner Targetgene, die am Zellzyklus, der Apoptose, sowie der DNA-Reparatur und -Replikation beteiligt sind, aktivieren. Dieser Schritt leitet die S-Phase ein, welche wesentliche Voraussetzung für eine effektive adenovirale Replikation ist. In Tab. 8 findet sich eine Auflistung der durch virale Vektoren beeinflussten E2F-Targetgene.

Tab. 8: Regulation der E2F-Targetgene durch Ad5-Ad312, Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen

E2F-Targetgene ¹		
	<i>erhöhte Expression</i>	<i>reduzierte Expression</i>
Ad5-Ad312		
Ad5-Delo3RGD	CALR, DHFR, EIF2AK2, RRM2	CENPA, HMGB3, MYC, RAD51AP1, STAM
Ad5-wt	BTG3, CALR, DHFR, CDC45L, PA2G4, RPA2, RRM2, TEAD4	BUB1, BUB1B, CCNA2, CDC2, CDC20, CDKN1B, CENPA, HMGB3, ID3, KPNA2 TOP2A

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene hatten einen *Fold Change* von ≥ 2 bzw. ≤ -2 und waren in mindestens zwei der drei untersuchten Gliomzelllinien in gleicher Weise reguliert.

Ad5-Ad312 regulierte die Expression keines E2F-Targetgens. Ad5-Delo3RGD hemmte 5 und steigerte die Expression von 4 E2F-Targetgenen. Das Wildtypvirus kontrollierte die Regulation von insgesamt 19 Genen, wobei 8 verstärkt und 11 geringer exprimiert wurden.

Eine ausführliche Auflistung der regulierten E2F-Targetgene, inklusive der *Fold Change*-Werte und der Gennamen, geordnet nach transduziertem Vektor und Zelllinie befindet sich im Anhang (Tab. 15).

4.2.2.2 Apoptose

Die Einleitung der Apoptose ist ein Schutzmechanismus der infizierten Wirtszelle, um die Ausbreitung der viralen Infektion auf Nachbarzellen zu verhindern. Das Virus versucht hingegen der zellulären Abwehr entgegenzuwirken (E1B, E3), damit es sich effizient in der Zelle replizieren kann [113,114,115,116,119]. In der späten Phase der Infektion wiederum, induzieren Adenoviren (E3-ADP) die Einleitung des Zelltods, um die neugebildeten viralen Partikel freizusetzen [140].

Die KEGG-Analyse von Apoptose-assoziierten Genen zeigte eine Hemmung, aber auch Hochregulation von pro- und antiapoptotischen Faktoren (Tab. 9).

Das *E1A* deletierte Ad5-Ad312 verstärkte die Expression von NGFB, welches pro- und antiapoptotische Prozesse einleiten kann. Außerdem wurde das pro-apoptotische APAF1 gehemmt, welches ebenfalls durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD in gleicher Weise beeinflusst wurde. Die Transduktion von Gliomzellen mit dem replikationskompetenten Wildtypvirus, das durch sein vollständiges Genom, insbesondere der *E1A*-Region, alle viralen Funktionen ausführen kann, resultierte in folgendem Expressionsmuster. Das Virus hatte Einfluss auf die Expression von 11 proapoptotischen Genen, von

denen 6 reprimiert und 5 verstärkt gebildet wurden. Desweiteren hemmte Ad5-wt 4 anti-apoptotische Faktoren bzw. erhöhte die Expression des anti-apoptotisch wirkenden AKT3. AKT3 wurde ebenfalls durch Ad5-Delo3RGD verstärkt gebildet. Aber auch der onkolytische Vektor hemmte die Expression von 4 anti-apoptotischen Genen. Darüber hinaus konnte Ad5-Delo3RGD die Expression von 5 proapoptotischen Genen reprimieren und von zwei weiteren verstärken. Neben den durch Ad5-wt regulierten 11 proapoptotischen und 5 anti-apoptotischen Genen, verstärkte das Wildtypvirus die Expression von CD40 und TP73, welche pro- und anti-apoptotische Prozesse einleiten können. Auch Ad5-Delo3RGD konnte neben seiner Wirkung auf 7 proapoptotischen und 2 anti-apoptotischen Genen, das MYC-Gen in seiner Expression hemmen, welches ebenfalls beide Eigenschaften besitzt.

Tab. 9: Regulation von Apoptose-assoziierten Genen durch Ad5-Ad312, Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen

Proapoptotische Gene ¹			Antiapoptotische Gene ¹	
	<i>erhöhte Expression</i>	<i>reduzierte Expression</i>	<i>erhöhte Expression</i>	<i>reduzierte Expression</i>
Ad5-Ad312		APAF1		
Ad5-Delo3RGD	BID, PARP1	APAF1, BNIP3L, FADD, NFKBIA, TNFRSF1A	AKT3	MCL1, NR3C1, PIK3CD, BCL2L1
Ad5-wt	BID, BCL2L11, DFFA, TRAF3, PRKAR1B	APAF1, BNIP3L, FADD, JUN, SFRS2IP, TNFRSF1A	AKT3	MCL1, NR3C1, PIK3R1, IRF2

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene hatten einen *Fold Change* von ≥ 2 bzw. ≤ -2 und waren in mindestens zwei der drei untersuchten Gliomzelllinien in gleicher Weise reguliert.

Eine ausführliche Auflistung, inklusive der *Fold Change*-Werte und der Gennamen, geordnet nach transduziertem Vektor und Zelllinie befindet sich im Anhang (Tab. 16).

4.2.2.3 Wnt-Signalweg

In Abb. 11 ist schematisch die Einflussnahme des replikationskompetenten Ad5-wt und des onkolytischen Ad5-Delo3RGD auf den Wnt-Signalweg in Gliomzellen dargestellt.

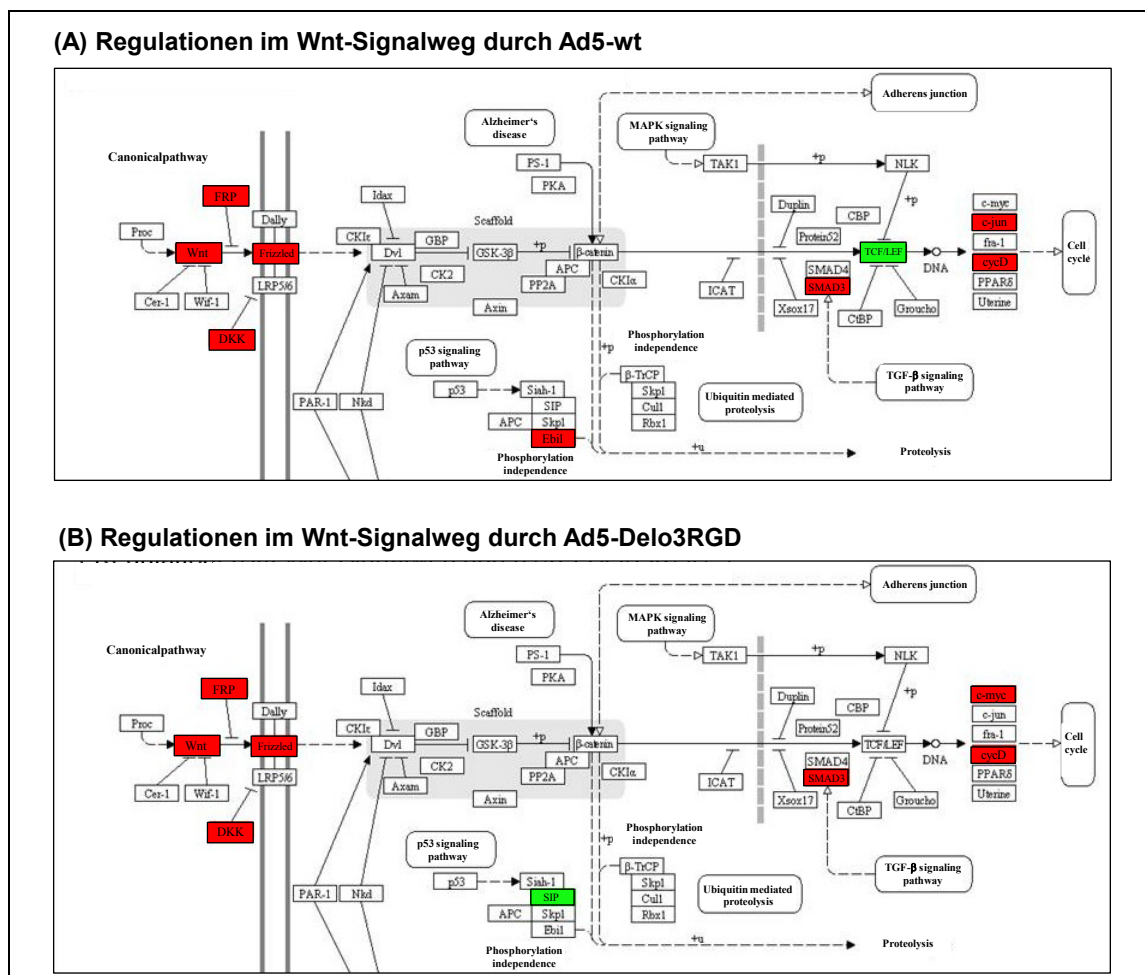


Abb. 11: Ausschnitt der Regulationen des kanonischen Wnt-Signalwegs in Gliomzellen durch die Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD.

Die Gliomzelllinien LN-18, U373-MG und U-87MG wurden mit den Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312 (10 MOI) transduziert. Nach zweitägiger Inkubation erfolgte die *Microarray*-Hybridisierung mit anschließender *Gene Set Enrichment*-Analyse. Das Wildtypvirus regulierte die Expression von 22, das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD von 20 Genen des Wnt-Signalwegs in mindestens zwei der getesteten Zelllinien. Ad312 hatte keinen Einfluss auf den Signalweg. Farblich hervorgehoben sind die reduziert (rot) und verstärkt (grün) differenziell exprimierten Gene. Erstellt wurde die Grafik mit Hilfe von Color Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Diese äußerte sich in einer Hemmung der Genexpression, mit Ausnahme des Inhibitors SIP (*Siah-interacting protein*), des Transkriptionsfaktors 7 (TCF7) und des Targetgens Cyclin D3. Beide Viren modulierten den Wnt-Signalweg durch die negative Regulation gleicher Gengruppen und Faktoren,

wie Inhibitoren (DKK1, LDLR, PAFAH1B1, SFRP1, VANGL1), Agonisten (NDP, SMAD3, TBL1X, TBL1XR1), Signalmoleküle (WNT5A, WNT5B), Rezeptoren (FZD2, FZD5, FZD7, LRP1) und Targetgene (Cyclin D1, Cyclin D3, CD44, IL-8, c-Myc, JUN, PLAU, VEGF). Eine ausführliche Auflistung inklusive der *Fold Change*-Werte der differenziell exprimierten Gene des Wnt-Signalwegs geordnet nach transduziertem Vektor und Zelllinie befindet sich im Anhang (Tab. 17).

4.2.2.4 TGF- β -Signalweg

Das Wildtypvirus und das onkolytische Ad5-Delo3RGD beschränkten sich in der Modulation des *Transforming Growth Factor* (TGF)- β -Signalwegs hauptsächlich auf die reduzierte Expression von Faktoren gleicher Gengruppen (Abb. 12).

Dazu gehörten einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren (SMAD3), Signalmoleküle (TGFB2, BMP6, BMP8B, LTBP1), mit der Signalweiterleitung assoziierte Gene (THBS1, DAB2, EP300), Antagonisten (FST, TGIF1, E2F5, FKBP1A), sowie Targetgene (ID3, MYC, SERPINE1, JUN). Trotz der Beeinflussung gleicher Kategorien, konnten sich die durch Ad5-wt und Ad-Delo3RGD regulierten Faktoren innerhalb der Gruppen, unterscheiden. Z.B. hemmte Ad5-Delo3RGD bei Genen der Signalweiterleitung die Expression von THBS1, Ad5-wt hingegen von EP300 und DAB2. Demgegenüber hemmte Ad5-wt das Targetgen JUN, Ad5-Delo3RGD aber ID3, MYC und SERPINE1. Beide viralen Vektoren reduzierten die Expression der Inhibitoren TGIF1 und Follistatin (FST), zusätzlich verstärkten aber Ad5-Delo3RGD die Bildung von E2F5 und FKBP1A. Ferner nahm das Wildtypvirus Einfluss auf die Gruppe der Rezeptoren (ACVR1, ACVR2, TGFBR2) im Gegensatz zum *E1A-13S* deletierten Ad5-Delo3RGD.

Eine ausführliche Auflistung inklusive der *Fold Change*-Werte der differenziell exprimierten Gene des TGF- β -Signalwegs geordnet nach transduziertem Vektor und Zelllinie befindet sich im Anhang (Tab. 14).

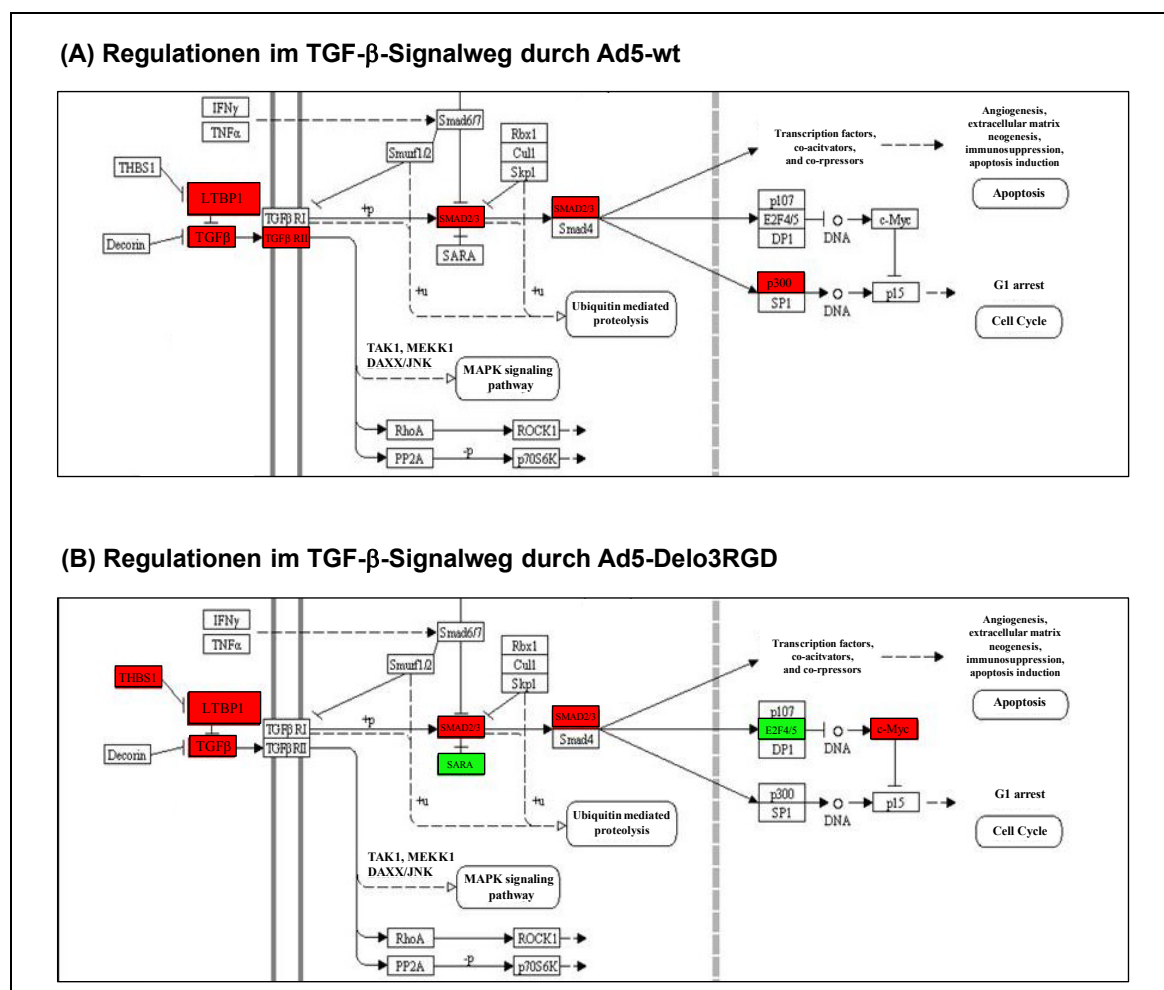


Abb. 12: Ausschnitt der Regulationen des TGF- β -Signalwegs in Gliomzellen durch die Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD.

Die Gliomzelllinien LN-18, U373-MG und U-87MG wurden mit den Ad5-wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312 (10 MOI) transduziert. Nach zweitägiger Inkubation erfolgte die *Microarray*-Hybridisierung mit anschließender *Gene Set Enrichment*-Analyse. Das Wildtypvirus, sowie das onkolytische Virus regulierten die Expression von 13 Genen des TGF- β -Signalwegs in mindestens zwei der getesteten Zelllinien. Ad312 hatte keinen Einfluss auf den Signalweg. Farblich hervorgehoben sind die reduziert (rot) und verstärkt (grün) differenziell exprimierten Gene. Erstellt wurde die Grafik mit Hilfe von Color Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/>).

4.2.3 Identifikation differenziell regulierter miRNA mittels 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse

Die *Gene Set Enrichment Analysis* zur Identifikation von differenziell exprimierten microRNA-Targetgenen sollte Aufschluss darüber geben, ob adenovirale Vektoren über die Regulation von miRNAs Einfluss auf Gliomzellen nehmen. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse von downregulierten Targetgenen durch Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen

3'-UTR miRNA Bindemotiv	miRNA	Anzahl der downregulierten miRNA-Targetgene ¹			miRNA ist in der Literatur assoziiert mit
		Ad5- Delo3RGD	Ad5- wildtyp	Ad5-Delo3RGD und Ad5- wildtyp ²	
GCACTTT	MIR-17-5P, MIR-20A, MIR-106A, MIR-106B, MIR-20B, MIR-519D	17	21	8	OE in kolorektalen Karzinomen [293], Burkitt's Lymphom [294] → Proliferation [294], potentielles Onkogen [295]
TGTTTAC	MIR-30A-5P, MIR-30C, MIR-30D, MIR-30B, MIR-30E-5P	16	27	12	OE in Medulloblastomen [296], Reduktion in Brustkrebs [297,298], Blasenkrebs [299], anaplastischen Schilddrüsentu- moren [300] → hemmt Apoptose, Tumor- Stammzellentwicklung [297] → Reduktion nach Ad3-Infektion [301]
ACCAAAG	MIR-9	16	15	8	OE im Gliom [302]
TGAATGT	MIR-181A, MIR-181B, MIR-181C, MIR-181D	11	20	8	Reduktion im Gliom [1,5,6], MIR- 181A negativ korreliert mit Tumorggrading → Tumorsuppressor, hemmt Multidrug-Resistenzen [7,8], Sensitivierung gegen Bestrahlung [9], hemmt Zellwachstum, Invasion und induziert Apoptose [5,303,304] → Reduktion nach Ad3-Infektion [301]

TGCTGCT	MIR-15A, MIR-15B,	10	16	5	OE in Gliomzellen [305], Pankreaskarzinom [306], Gebärmutterhalskrebs [307] → fördert Zellzyklusprogression → OE durch E1A [308]
	MIR-195,				Reduktion in kolorektalen Karzinomen [309], Blasenkrebs [299], Magenkarzinom [310] → fördert Apoptose [309], Temozolomid-Resistenz im GBM [311] → OE durch E1A [308]
TGCCTTA	MIR-124A	12	15	4	Reduktion im Gliom [302] → hemmt Proliferation, fördert Differenzierung von Tumorstammzellen [302]
CACTGTG	MIR-128A, MIR-128B	9	14	6	Reduktion im Gliom [1,2,3] → hemmt Proliferation [2,3]
TTGCCAA	MIR-182	11	15	8	OE im Gliom [312], Lungenkarzinom [313], Kolonkarzinom [314], Prostatakrebs [315] → Prognostischer Marker im Gliom: Grading, negativ korreliert mit Überleben [312] → OE durch E1A [308]

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene waren mindestens um den Faktor 2 im Vergleich von adenoviral transduzierten zu unbehandelten Zellen negativ reguliert, d.h. der *Fold Change* war ≤ -2 .

⁽²⁾ Die Anzahl der Gene, die nach der Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD in ihrer Expression gehemmt wurden.

OE = *overexpressed*; überexprimiert

Die replikationsinkompetente *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 hatte keinen messbaren Einfluss auf die Targetgene von microRNAs. Wohingegen das *E1A*-13S deletierte Ad5-Delo3RGD und das Wildtypvirus die Expression von potentiellen microRNA-Targetgenen negativ beeinflussten (Tab. 10). Dabei zeigten beide Vektoren eine Wirkung auf die gleichen miRNAs. Die durch die Vektoren differenziell exprimierten Targetgene einer microRNA waren z.T. dieselben, z.T. wurden durch die Vektoren unterschiedliche Targetgene reguliert. Insgesamt wurden 25 3'-UTR Bindemotive gefunden, von deren po-

tentiellen microRNA-Targetgenen mindestens 9 Gene durch Ad5-wt oder Ad5-Delo3RGD reguliert wurden. Die Mehrheit der potentiellen Targetgene wurden in ihrer Expression durch die Vektoren gehemmt.

Fünf dieser microRNAs (MIR-181, MIR-15B, MIR-124, MIR-128, MIR-153) werden bereits in einem Zusammenhang mit Gliomen gebracht, zwei bis drei weitere (MIR-30, MIR-9, MIR-17-92cluster) stehen in Beziehung mit anderen Tumoren. Zusätzlich stehen einige wenige miRNAs (MIR-92, MIR-182, MIR-25, MIR-27, MIR-148, MIR-101, MIR-19) in Verdacht durch adenovirale Faktoren beeinflusst zu werden.

Eine detaillierte Ergebnisliste der *3'-UTR microRNA binding sites*-Analyse, die alle differenziell exprimierten Targetgene beinhaltet, befindet sich im Anhang (Tab. 19).

4.3 Validierung der differentiellen Expressionsdaten des *Microarrays* mittels *real-time* RT-PCR

Um die Ergebnisse aus der *Microarray*-Analyse mit einer unabhängigen Methode bestätigen zu können, wurden für jeden Signalweg repräsentativ eine Auswahl an Genen in der *real-time* RT-PCR vermessen. Zu diesem Zweck wurden die Gliomzelllinien LN-18, LN-229, U-373MG und U-87MG mit 10 MOI adenoviralen Vektor transduziert. Nach 72 Stunden erfolgte die Isolation (Kapitel 3.2.5). Als Negativkontrolle wurden die Zellen ausschließlich mit Transduktionsmedium behandelt (Kapitel 3.3.3). Die dargestellten *Fold Change*-Werte wurden auf die Expression des Referenzgens 18S rRNA bezogen. Die Ergebnisse der zweiten Referenz, GAPDH, bestätigten jedoch die Messungen und Berechnungen der auf 18S rRNA normalisierten Werte (nicht gezeigt).

In den Tabellen wurden die als signifikant betrachteten Ergebnisse, dementsprechend mit einem *Fold Change* ≥ 2 oder ≤ -2 , hervorgehoben. Nicht signifikante *Fold Change*-Berechnungen der *Microarray*-Analyse konnten aufgrund der fehlenden Ausgabe der bioinformatischen Auswertung nur mit einem „-“ gekennzeichnet werden, wohingegen die berechneten Werte aus der *real-time* RT-PCR angegeben werden.

4.3.1 E2F-Targetgene

Die Validierung der *Microarray*-Daten für die E2F-Targetgene wurde exemplarisch für 3 Faktoren untersucht (Tab. 11). Das replikationskompetente Ad5-Ad312 zeigte auch in der *real-time* RT-PCR keinen signifikanten Einfluss auf die Expression ausgesuchter Faktoren. Lediglich in U-373MG induzierte der Vektor eine Hemmung der Topoisomerase II alpha (TOP2A).

Die Ergebnisse des Wildtypvirus ließen sich nur partiell bestätigen. Bei der Hemmung der TOP2A bzw. der Induktion von DHFR in Gliomzellen im Allgemeinen konnte der Trend der *Microarray*-Resultate durch die *real-time* RT-PCR bestätigt werden, auch wenn die Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien

z.T. nicht reproduziert werden konnte. Beispielsweise wurde eine reduzierte Expression von TOP2A in U-373MG im *Microarray* festgestellt, mittels *real-time* PCR war die Regulation jedoch nicht mehr signifikant. Gleiches galt für die Regulation von DHFR und TOP2A durch Ad5-Delo3RGD. Im Allgemeinen ließ sich der Trend der Beeinflussung in Gliomzellen bestätigen. Die neuen Ergebnisse der *real-time* RT-PCR konnten die differenzielle Expression von CALR durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD vom *Microarray* nicht bestätigen. Das onkolytische Virus führte nicht zu einer Induktion, sondern zu einer Hemmung von CALR, ferner konnte dem Wildtypvirus keine signifikante Regulation nachgewiesen werden. Insgesamt konnte die *Microarray*-Analyse für E2F-Targetgene nur z.T. bestätigt werden.

Tab. 11: Überprüfung der *Microarray*-Daten von E2F-Targetgenen anhand einer Auswahl an Faktoren mittels *real-time* RT-PCR, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Assay	Ad5-Ad312				Ad5-Delo3RGD				Ad5-wildtyp			
		LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG
CALR	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>4.92</u>	n.v.	<u>2.39</u>	<u>3.29</u>	<u>5.66</u>	n.v.	<u>3.53</u>	<u>2.84</u>
	<i>PCR</i>	1,39	0,24	1,11	1,17	0,76	-1,85	<u>-2.02</u>	<u>-4.48</u>	1,39	-1,32	-0,63	0,05
DHFR	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>2.83</u>	n.v.	<u>2.61</u>	<u>2.70</u>	<u>2.14</u>	n.v.	<u>2.64</u>	<u>2.30</u>
	<i>PCR</i>	-1,18	-0,10	-1,38	-1,09	<u>2.07</u>	1,88	<u>3.89</u>	1,89	1,63	-0,05	<u>2.4</u>	<u>2.52</u>
TOP2A	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	-	<u>-2.83</u>	n.v.	<u>-4.16</u>	<u>-2.47</u>
	<i>PCR</i>	-0,65	1,17	<u>-4.62</u>	-1,38	0,53	0,21	1,63	-0,1	<u>-2.55</u>	<u>-2.74</u>	-1,86	0,33

(-) Es wurde keine signifikante differenzielle Expression im *Microarray* ermittelt.

(n.v.) LN-229 wurde im *Microarray*-Versuch nicht vermessen.

Der *Fold Change* von als signifikant betrachteten differenziell exprimierten Genen, d.h. ≥ 2 bzw. ≤ -2 , ist hervorgehoben.

4.3.2 Apoptose-assoziierte Gene

Für die Überprüfung der Genexpression der Apoptose-assoziierten Gene, wurden 4 pro- (BNIP3L, FADD NFKBIA, JUN) und 2 anti-apoptotische (MCL1, BCL2L1) Faktoren ausgewählt (Tab. 12).

Tab. 12: Überprüfung der *Microarray*-Daten von Apoptose-assoziierten Genen anhand einer Auswahl an Faktoren mittels *real-time* RT-PCR, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Assay	Ad5-Ad312				Ad5-Delo3RGD				Ad5-wildtyp			
		LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG
BNIP3L	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-9,85</u>	n.v.	<u>-3,48</u>	<u>-3,73</u>	<u>-11,31</u>	n.v.	<u>-22,63</u>	<u>-3,73</u>
	<i>PCR</i>	-0,05	0	0,01	-0,04	-0,58	-1,42	<u>-2,59</u>	<u>-3,55</u>	1,03	0,23	-1,80	-1,38
FADD	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-3,03</u>	n.v.	-	<u>-3,48</u>	<u>-2,14</u>	n.v.	<u>-2,83</u>	<u>-2,83</u>
	<i>PCR</i>	-1,12	1,18	-0,11	1,13	-0,14	-1,32	-1,46	-1,15	1,23	-0,40	-1,42	1,81
JUN	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	<u>-3,81</u>	<u>-2,14</u>	n.v.	<u>-5,48</u>	<u>-2,65</u>
	<i>PCR</i>	-0,49	1,18	-1,27	-1,17	<u>-2,47</u>	<u>-6,09</u>	<u>-3,66</u>	<u>-4,95</u>	-1,4	-1,67	<u>-2,14</u>	0,04
NFKBIA	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-4,00</u>	n.v.	<u>-2,64</u>	<u>-2,64</u>	<u>-3,73</u>	n.v.	-	-
	<i>PCR</i>	-0,02	1,24	0,03	-1,20	-0,76	-1,53	-1,8	<u>-3,12</u>	-1,21	-1,44	-0,44	-0,05
BCL2L1	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	-	n.v.	<u>-2,30</u>	<u>3,30</u>	-	n.v.	-	<u>-2,56</u>
	<i>PCR</i>	1,16	0,17	-1,46	-1,09	-0,10	-1,07	-0,81	<u>-5,92</u>	1,10	-1,26	0,33	-0,10
MCL1	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-2,64</u>	n.v.	-	<u>-2,64</u>	<u>-2,83</u>	n.v.	<u>-2,47</u>	<u>-2,60</u>
	<i>PCR</i>	1,43	0,09	-1,88	-1,13	<u>-2,15</u>	-1,77	<u>-3,69</u>	<u>-8,44</u>	-1,47	-1,82	-1,98	-1,10

(-) Es wurde keine signifikante differenzielle Expression im *Microarray* ermittelt.

(n.v.) LN-229 wurde im *Microarray*-Versuch nicht vermessen.

Der *Fold Change* von als signifikant betrachteten differenziell exprimierten Genen, d.h. ≥ 2 bzw. ≤ -2 , ist hervorgehoben.

Dem *E1A*-deletierten Ad5-Ad312 konnte keine signifikante Regulation auf die Gene nachgewiesen werden, die Daten der *Microarray*-Analyse haben sich damit bestätigt. Wohingegen die Ergebnisse für den Einfluss von Ad5-wt auf BNIP3L, FADD, JUN, NFKBIA und MCL1 nicht reproduziert werden konnten. Die Messungen ergaben keine signifikante Regulation. Gleiches galt für Ad5-Delo3RGD und seine Wirkung auf 4 der ausgewählten 6 Faktoren. In der *real-time* PCR induzierte Ad5-Delo3RGD eine Hemmung von JUN. Während die Wirkung auf FADD, NFKBIA und BCL2L1 nicht signifikant war.

Jedoch konnten sich der Trend des hemmenden Einflusses des onkolytischen Virus in Gliomzelllinien auf das antiapoptotische MCL1 und das proapoptotische BNIP3L bestätigen.

4.3.3 Wnt-Signalweg

Aus der KEGG-Analyse ging der Wnt-Signalweg als Kategorie mit der größten Anzahl an differenziell exprimierten Genen, nach viraler Transduktion von Gliomzellen hervor. Für die Validierung der *Microarray*-Daten wurden exemplarisch zwei Faktoren ausgewählt, sowie ein zusätzliches Gen, welches eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Aus der Chip-Analyse wurden der Antagonist DKK1 und das Targetgen VEGF-A ausgesucht, zusätzlich wurde das Schlüsselprotein des Signalwegs β -Catenin für die Überprüfung des Einflusses der adenoviralen Vektoren vermessen (Tab. 13).

Tab. 13: Überprüfung der *Microarray*-Daten des Wnt-Signalwegs anhand einer Auswahl an Genen mittels *real-time* RT-PCR, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Assay	Ad5-Ad312				Ad5-Delo3RGD				Ad5-wildtyp			
		LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG
β -Catenin	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	-
	<i>PCR</i>	0,54	0,03	-1,13	-1,12	-0,20	-1,57	<u>-3,25</u>	<u>-4,24</u>	-1,02	-1,88	<u>-2,51</u>	-1,24
DKK1	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-18,38</u>	n.v.	<u>-3,48</u>	<u>-8,00</u>	<u>-4,59</u>	n.v.	<u>-2,46</u>	<u>-3,73</u>
	<i>PCR</i>	0,88	0,84	-1,33	0,05	<u>-2,03</u>	<u>-2,68</u>	<u>-5,85</u>	<u>-95</u>	0	-1,57	<u>-2,48</u>	-1,31
VEGF-A	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-3,98</u>	n.v.	-	<u>-2,64</u>	<u>-2,59</u>	n.v.	<u>-3,48</u>	-
	<i>PCR</i>	1,93	1,50	1,41	1,08	<u>-3,49</u>	-0,69	<u>-6,08</u>	<u>-21,85</u>	0,81	0,74	-1,53	-1,4

(-) Es wurde keine signifikante differenzielle Expression im *Microarray* ermittelt.

(n.v.) LN-229 wurde im *Microarray*-Versuch nicht vermessen.

Der *Fold Change* von als signifikant betrachteten differenziell exprimierten Genen, d.h. ≥ 2 bzw. ≤ -2 , ist hervorgehoben.

Für das Virus Ad5-Ad312 konnte bestätigt werden, dass keine Regulation auf die ausgewählten Faktoren vorhanden waren. Das onkolytische Virus zeigte in der *real-time* PCR-Analyse eine Hemmung von DKK1 und VEGF-A in Gliomzellen, wodurch die Beobachtungen der Chip-Analyse bestätigt werden

konnten. Zusätzlich konnte Ad5-Delo3RGD in zwei (U-373MG, U-87MG) der vier Zelllinien die Expression von β -Catenin reduzieren. Das Wildtypvirus hatte auf dieses Signalmolekül nur in U-373MG eine hemmende Wirkung. Desweiteren konnte der in der *Microarray*-Auswertung festgestellte inhibitorische Trend auf DKK1 und den Angiogenesefaktor VEGF-A nicht bestätigt werden.

Für das Wildtypvirus konnten der im *Microarray* beobachtete Einfluss auf Faktoren des Wnt-Signalwegs nicht bestätigt werden, im Gegensatz zum Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312. Ad5-Ad312 und Ad5-wt zeigten keine signifikante Regulation auf die ausgewählten Gene. Das onkolytische Virus hatte hingegen auf alle ausgewählten Faktoren, wie Signaltransduktionsmoleküle, Inhibitoren und Targetgene, eine hemmende Wirkung.

4.3.4 TGF- β -Signalweg

Eine weitere Gruppe, die nach der *Gene Set Enrichment*-Analyse für Signaltransduktionswege, eine auffällig konzentrierte differenzielle Expression von Genen aufwies, war der TGF- β -Signalweg.

Das Wildtypvirus, sowie das onkolytische Ad5-Delo3RGD regulierten 13 Faktoren, darunter befanden sich Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle, an die Signalweiterleitung assoziierte Gene, Antagonisten, sowie Targetgene. Um die in der Auswertung des *Microarray* vornehmliche Hemmung der Expression durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD zu bestätigen, wurden repräsentativ der Antagonist FST, das Targetgen MYC, das an der Sekretierung von TGF- β -Signalmolekülen beteiligte LTBP1 und der Transkriptionsfaktor SMAD3 für die *real-time* RT-PCR ausgewählt (Tab. 14). Zusätzlich zu den Ergebnissen der *Microarray*-Analyse wurde die Expression von SMAD2 bestimmt. Nach der Stimulation des TGF- β -Rezeptors I bildet dieser mit dem TGF- β -Rezeptor II einen Komplex und phosphoryliert SMAD2 bzw. SMAD3. Die so aktivierten SMAD2/3 bilden einen Komplex mit Smad4, dieser Komplex gelangt in den Zellkern und reguliert dort die Expression verschiedener Gene [316].

Das replikationsinkompetente Virus Ad5-Ad312 zeigte weder in der Chip- noch in den *real-time* RT-PCR-Versuchen eine Regulation der untersuchten Faktoren. Das replikationskompetente Wildtypvirus beeinflusste nicht die Expression von SMAD2, desweiteren konnte die Hemmung von LTBP1 nicht bestätigt werden. Die *real-time* PCR-Versuche erhärteten die Vermutung aus dem *Microarray*-Experiment, das Ad5-wt keinen Einfluss auf MYC nimmt. Ferner konnte die inhibitorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor SMAD3 und den Antagonisten FST reproduziert werden. Die *real-time* PCR-Analyse zeigte einen klaren hemmenden Einfluss von Ad5-Delo3RGD auf die untersuchten Faktoren des TGF- β -Signalweges in Gliomzellen. Die Resultate der *Microarray*-Analyse konnten bestätigt werden. Außerdem verringerte das onkolytische Virus die Expression von SMAD2.

Der Einfluss des Wildtypvirus konnte auf die ausgewählten Gene des TGF- β -Signalwegs teilweise bestätigt werden (SMAD3, FST, MYC). Die nicht signifikante Regulationen bzw. hemmende Wirkung von Ad5-Ad312 und Ad5-Delo3RGD (SMAD3, LTBP1, FST, MYC) ließ sich reproduzieren. Zusätzlich induzierte das onkolytische Virus ebenfalls eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors SMAD2.

Tab. 14: Überprüfung der *Microarray*-Daten des TGF- β -Signalwegs anhand einer Auswahl an Genen mittels *real-time* RT-PCR, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Assay	Ad5-Ad312				Ad5-Delo3RGD				Ad5-wildtyp			
		LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	LN-229	U-373 MG	U-87 MG
SMAD2	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	-	-	n.v.	-	-
	<i>PCR</i>	1,2	1,22	-1,35	-1,03	-1,53	<u>-2,11</u>	<u>-2,12</u>	<u>-10,41</u>	-0,19	-1,82	-1,63	0,03
SMAD3	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-6,11</u>	n.v.	<u>-33,05</u>	<u>-5,35</u>	<u>-5,91</u>	n.v.	<u>-5,89</u>	-
	<i>PCR</i>	-1,51	0,03	-1,99	-0,62	<u>-4,87</u>	<u>-2,97</u>	<u>-6,39</u>	<u>-5,39</u>	-1,69	<u>-2,08</u>	<u>-2,67</u>	-1,47
LTBP1	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-2,83</u>	n.v.	-	<u>-3,48</u>	<u>-2,46</u>	n.v.	<u>-2,30</u>	<u>-2,14</u>
	<i>PCR</i>	1,32	0,74	-0,54	-1,18	-0,09	<u>-2,35</u>	<u>-6,41</u>	<u>-14,88</u>	-1,05	-1,22	<u>-2,57</u>	-1,29
FST	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-6,96</u>	n.v.	-	<u>-15,61</u>	<u>-4,90</u>	n.v.	<u>-2,30</u>	<u>-3,25</u>
	<i>PCR</i>	1,3	0,12	1,38	0,06	<u>-2,51</u>	<u>-11,6</u>	-0,13	<u>-5,28</u>	<u>-2,33</u>	<u>-2,31</u>	-0,01	-1,14
MYC	<i>Biochip</i>	-	n.v.	-	-	<u>-3,25</u>	n.v.	<u>-3,25</u>	<u>-8,57</u>	-	n.v.	-	-
	<i>PCR</i>	-0,13	1,17	-1,25	-1,07	<u>-2,17</u>	<u>-3,71</u>	<u>-2,54</u>	<u>-4,76</u>	1,32	-1,15	0,17	1,35

(-) Es wurde keine signifikante differenzielle Expression im *Microarray* ermittelt.

(n.v.) LN-229 wurde im *Microarray*-Versuch nicht vermessen.

Der *Fold Change* von als signifikant betrachteten differenziell exprimierten Genen, d.h. ≥ 2 bzw. ≤ -2 , ist hervorgehoben.

4.4 Validierung der *Microarray*-Ergebnisse auf Protein-Ebene

Die in Kapitel 4.3 validierten Daten zum Einfluss von Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD, bzw. nicht-Einfluss von Ad5-Ad312 auf den Wnt- und TGF- β -Signalweg wurden auf mRNA-Ebene erhoben. Um zu untersuchen ob die beobachteten differenziellen Genexpressionen in einer veränderten Proteinsynthese der untersuchten Faktoren und damit zu einer Regulation des entsprechenden Signaltransduktionsweges führten, sollte durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Methoden überprüft werden. Zum einen wurde das Proteinlevel von Schlüsselfaktoren vor und nach viraler Transduktion mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens (Kapitel 3.2.14) bestimmt. Zum Anderen wurde die Sekretion von Signalmolekülen mittels ELISA-Technik (Kapitel 3.2.15) überprüft.

4.4.1 Western Blot-Analyse

4.4.1.1 Wnt-Signalweg

Nach erfolgter globaler Expressionsanalyse durch die *Microarray*-Technik und anschließender Validierung mittels *real-time* PCR sollte die beobachtete Hemmung auf Wnt-Faktoren durch Ad5-Delo3RGD und die teilweise inhibitorische Wirkung von Ad5-wt auf Proteinebene überprüft werden. Zu diesem Zweck erfolgte die Untersuchung von nicht-phosphorylierten, sowie phosphorylierten β -Catenin mittels Western Blot-Techniken.

Es konnte kein eindeutiger Nachweis erbracht werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren Einfluss auf die Inaktivierung durch Phosphorylierung (nicht gezeigt) oder die Proteinsynthese des essentiellen Signalmoleküls β -Catenin nehmen.

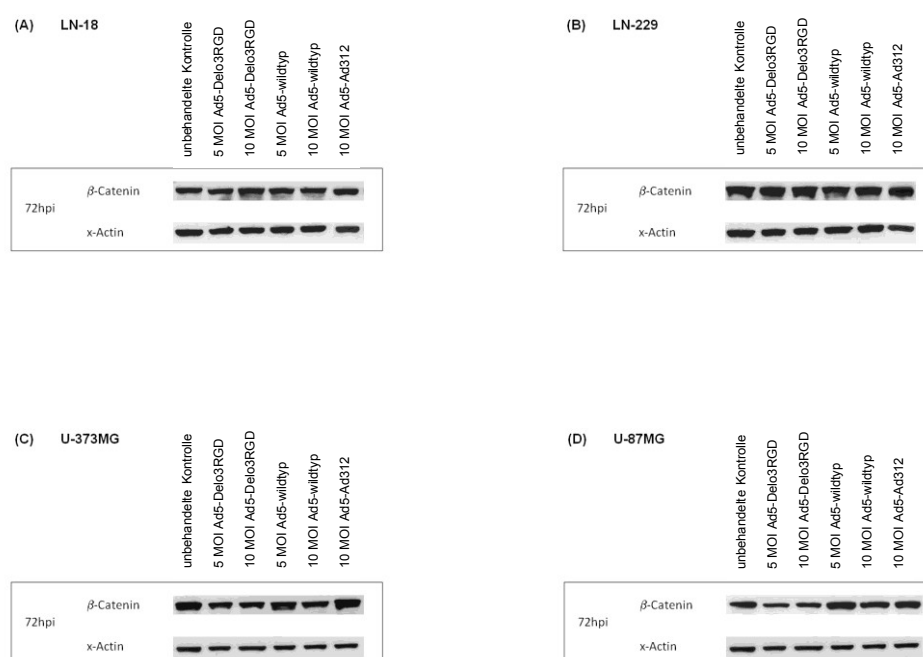


Abb. 13: Die adenovirale Transduktion hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Signalmoleküls β -Catenin.

Western Blot-Analyse von β -Catenin (92 kDa) in den humanen Glioblastomzelllinien (A) LN-18, (B) LN-229, (C) U-373MG sowie (D) U-87MG nach 72-stündiger Transduktion mit Ad-5wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312. Als Ladungskontrolle wurden die Membranen mit Actin-spezifischen Antikörper (42 kDa) inkubiert.

4.4.1.2 TGF- β -Signalweg

Wie die mRNA-Expressionsanalysen zeigten (Kapitel 4.2.2 und 4.3), haben die verwendeten Adenoviren unterschiedliche biologische Effektivitäten bei der Hemmung von Faktoren des TGF- β -Signaltransduktionsweges gezeigt. Für die Analyse der biologischen Effekte der viralen Transduktion auf den TGF- β -Signalweg von Gliomzellen auf Proteinebene, erfolgte die Western Blot-Analyse von nicht-phosphorylierten, sowie phosphorylierten SMAD2 und SMAD3.

Die Infektion mit den verwendeten Adenoviren hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungs-Status von SMAD2 und SMAD3, sowie auf das Proteinlevel von SMAD2 (nicht gezeigt)

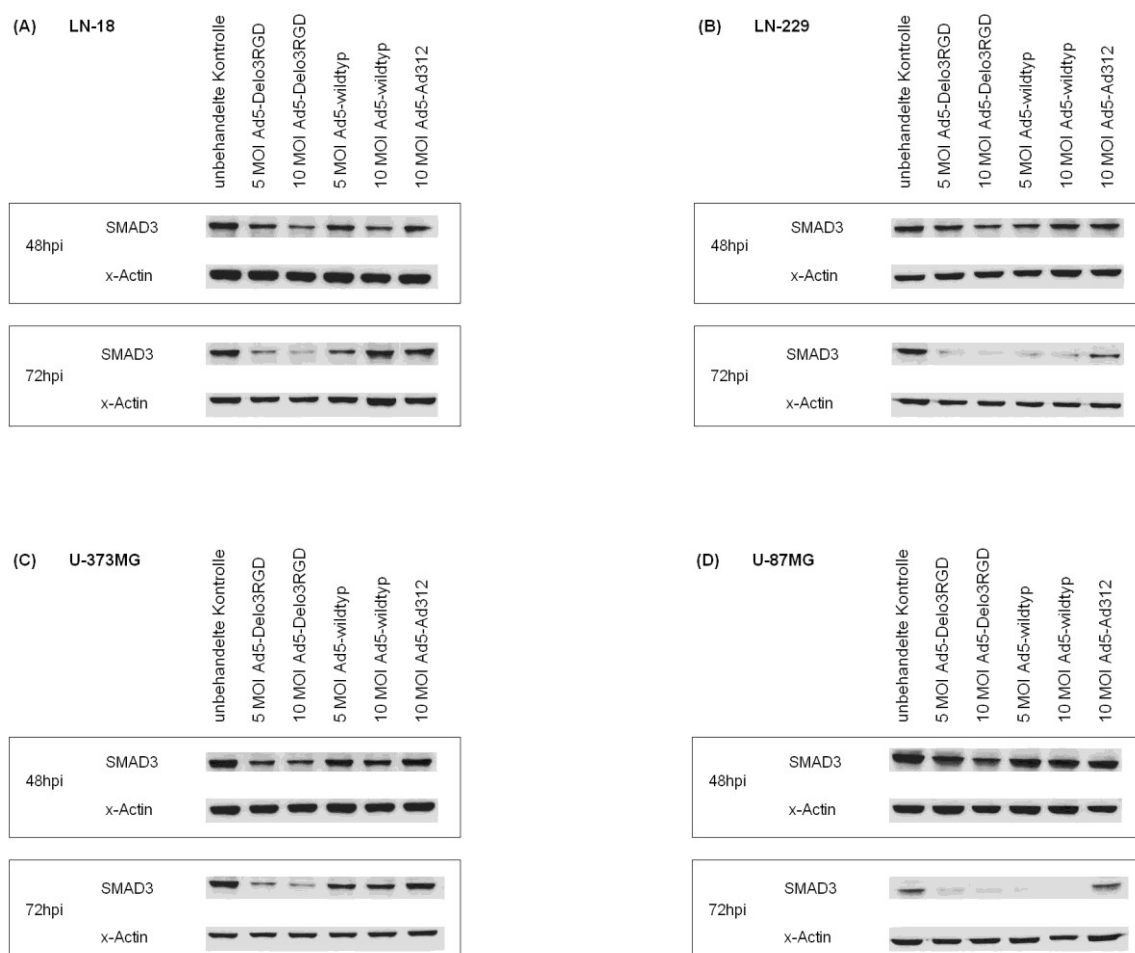


Abb. 14: Inhibition der SMAD3-Proteinexpression nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt.

Western Blot-Analyse des Transkriptionsfaktors SMAD3 (52 kDa) in den humanen Glioblastomzelllinien (A) LN-18, (B) LN-229, (C) U-373MG sowie (D) U-87MG nach 48- sowie nach 72-stündiger Transduktion mit Ad-5wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312. Als Ladungskontrolle wurden die Membranen mit Actin-spezifischen Antikörper (42 kDa) inkubiert.

48 h Postinfektion zeigten die viralen Vektoren zunächst keinen Einfluss auf die Proteinexpression von SMAD3. 72 h nach Transduktion konnte das replikationsinkompetente Ad5-Ad312 keine Veränderung im zellulären SMAD3-Proteingehalt induzieren (Abb. 14). Dieses Ergebnis korrespondierte mit den Resultaten der mRNA-Analysen (Tab. 14). Wie die Effekte von Ad5-Delo3RGD auf die SMAD3-Expression erwarten ließen, wurde die Proteinsynthese nach 3 Tagen in allen Zelllinien deutlich inhibiert, in LN-18 ließ sich dieser Trend bereits nach 48 h erkennen. Wohingegen das Wildtypvirus nur in LN-229 und U-87MG einen biologischen Effekt hatte.

4.4.2 Sekretionsassay

Um die biologischen Effekte auf Proteinebene zu untersuchen, wurden ebenfalls Sekretionsassays (R&D Systems) durchgeführt (Kapitel 3.2.15). Diese bieten durch ELISA-Technik die Möglichkeit Modulationen im Proteinlevel von Faktoren zu bestimmen, die aufgrund ihrer Sezernierung nicht oder nur schwer mit dem Western Blot-Verfahren detektiert werden können.

4.4.2.1 Angiogenesefaktor VEGF

Nach Validierung der *Microarray*-Ergebnisse des Wnt-Signalwegs durch die *real-time* PCR, zeigte das onkolytische Virus eine hemmende Aktivität auf die Expression des Wnt-Antagonisten DKK1, sowie z.T. auf das Signalmolekül β -Catenin. Die inhibitorischen Effekte des Wildtypvirus ließen sich nicht bestätigen (Kapitel 4.3). Auf Proteinebene konnte kein Einfluss der verwendeten Adenoviren auf β -Catenin festgestellt werden (siehe oben).

VEGF ist ein Targetgen des Wnt-Signalweges. Das onkolytische Virus und Ad5-wt zeigten eine negative Regulation in der *Microarray*-Analyse, die allerdings nur für Ad5-Delo3RGD in der *real-time* PCR-Messung bestätigt werden konnte.

In Abb. 15 (A) ist ein **Sekretionsprofil von VEGF** in den verwendeten humanen Glioblastomzelllinien gezeigt. Dieser Grafik lässt sich entnehmen, dass LN-18 (14700 pg/mL) und U-373MG (18000 pg/mL) annähernd gleiche Mengen des Signalmoleküls sezernierten. Wohingegen LN-229 keine detektierbaren Spuren von VEGF aufwies und U-87MG (56000 pg/mL) eine sehr hohe VEGF-Sekretion hatte.

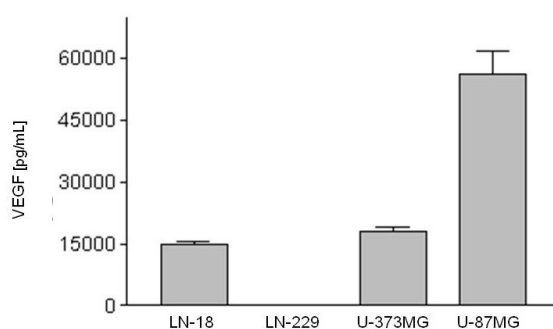
Aufgrund der großen Unterschiede in der Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* erfolgte die Darstellung der Ergebnisse in „Prozent bezogen auf die unbehandelten Kontrolle“.

Abb. 15 (B) beschreibt die Sekretion von **VEGF** in Gliomzellen 72 h nach viraler Transduktion. Ad5-Ad312 hatte keinen biologischen Effekt auf die Zelllinien LN-18 und U-87MG. In U-373MG induzierte die *E1A*-Deletante jedoch eine signifikante Steigerung der Sekretion um 68 % ($p < 0,01$), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Die Aktivität des onkolytischen Virus Ad5-Delo3RGD resultierte in einer Hemmung von VEGF um 50 - 60 % in den Gliomzelllinien LN-18 ($p < 0,01$) und U-373MG ($p <$

0,001). In den U-87MG-Zellen inhibierte das Virus, nicht signifikant, die Sekretion des Angiogenesefaktors um 23 %. Auch Ad5-wt hatte lediglich einen schwachen, jedoch signifikanten ($p < 0,1$), hemmenden Effekt auf die Sekretion von VEGF in U-87MG (um 25 %). Eine stärkere biologische Aktivität übte das Wildtypvirus auf LN-18 ($p < 0,01$) sowie U-373MG ($p < 0,001$) aus und inhibiert die Sezernierung des Signalmoleküls um 35 – 40 %.

Das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD und das Wildtypvirus hatten einen biologischen Effekt auf die Glioblastomzelllinien, welcher in einer hoch signifikanten Hemmung der Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* um bis zu 50 – 60 % resultierte. In der Gliomzelllinie mit der höchsten VEGF-Sezernierung, U-87MG, hatten beiden Vektoren eine geringere Effektivität.

(A)



(B)

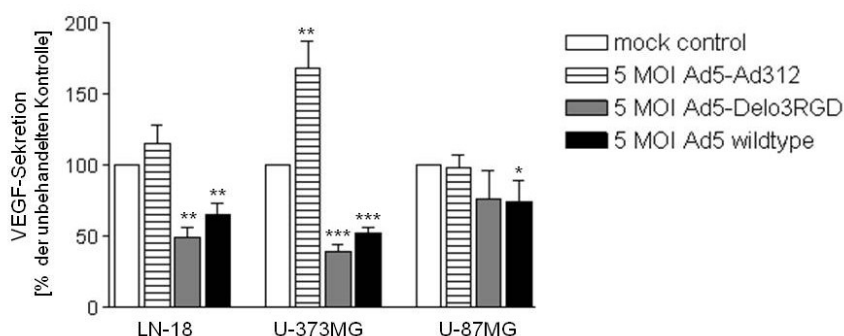


Abb. 15: Inhibition der Sekretion des Angiogenesefaktors VEGF in Gliomzelllinien nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt.

Die Sekretion von VEGF durch die Glioblastomzelllinien LN-18, LN-229, U-373MG sowie U-87MG ohne Behandlung (A) und nach 72-stündiger Transduktion mit Ad-5wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312 (B), (C). 24 h Postinfektion erfolgte ein Mediumwechsel, nach weiteren 48 h wurde der Überstand abgenommen, vermessen und auf die Gesamtproteinfärbung mittels Sulforhodamin B bezogen. Signifikanzen: (*) $p < 0,1$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

4.4.2.2 TGF- β -Signalweg

Die unterschiedlichen biologischen Effektivitäten von Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD in der Hemmung von Faktoren des TGF- β -Signaltransduktionsweges konnten bereits auf mRNA-Ebene (Kapitel 4.2.2 und 4.3) sowie auf Proteinebene (Kapitel 4.4.1) gezeigt werden. Für die Analyse der biologischen Effekte auf den TGF- β -Signalweg von Gliomzellen sollte zudem untersucht werden, ob die dokumentierte Expressionshemmung von SMAD3 zu einem Einfluss auf die Sekretion der Zytokine TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 führt.

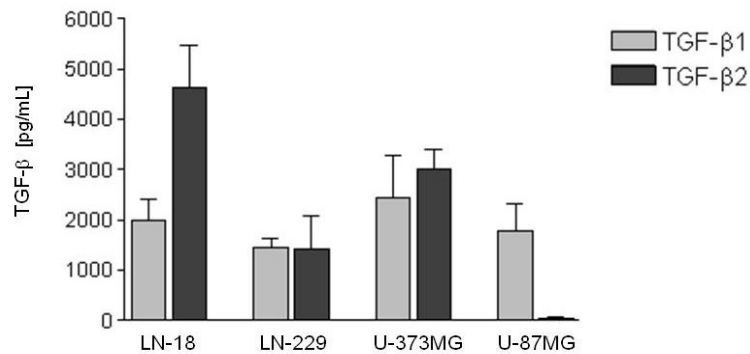
In Abb. 16 (A) ist zunächst das **Zytokinprofil der TGF- β 1 und - β 2-Sekretion** der verwendeten humanen Glioblastomzelllinien dargestellt. Daraus lässt sich entnehmen, dass die Zelllinien unterschiedliche Zytokin-Grundvoraussetzungen hatten. Alle Zelllinien sezernierten in etwa gleiche Mengen TGF- β 1 (1800 – 2200 pg/mL), unterschieden sich jedoch in ihrer TGF- β 2-Bildung. LN-18 hatte z.T. doppelt so hohe TGF- β 2-Konzentrationen (4600 pg/mL) im Zellkulturüberstand als LN-229 (1400 pg/mL) und U-373MG (3200 pg/mL). U-87MG hingegen produzierte keine messbaren Mengen von TGF- β 2.

Um den unterschiedlichen Zytokinprofilen Rechnung zu tragen, erfolgte die Darstellung der Sekretionsdaten nach viraler Transduktion in „Prozent bezogen auf die unbehandelten Kontrolle“.

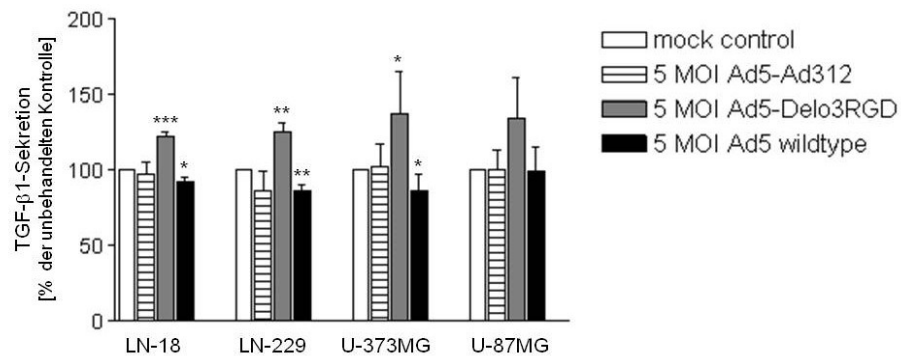
Abb. 16 (B) beschreibt die Sekretion von **TGF- β 1** in Gliomzellen nach viraler Transduktion. Das replikationsinkompetente Ad5-Ad312 hatte keinen biologischen Effekt und beeinflusste die Sekretion des Zytokins nicht signifikant. Das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD induzierte in LN-18 ($p < 0,001$), LN-229 ($p < 0,01$) und U-373MG ($p < 0,01$) eine Steigerung der TGF- β 1-Sekretion um 20-30 %. Dieser Trend ließ sich ebenfalls in U-87MG erkennen, war aber aufgrund der zu hohen Standardabweichung nicht signifikant. Das Wildtypvirus hatte keinen deutlichen Effekt auf die Sekretion von TGF- β 1, es erfolgte lediglich eine Reduktion um etwa 10 % in LN-18 ($p < 0,1$), LN-229 ($p < 0,01$) und U-373MG ($p < 0,1$).

Das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD hatte einen signifikanten, aber nur moderaten, biologischen Effekt auf die TGF- β 1-Sekretion von Gliomzellen, ebenso wie das Wildtypvirus, welches einen marginalen Einfluss zeigte.

(A)



(B)



(C)

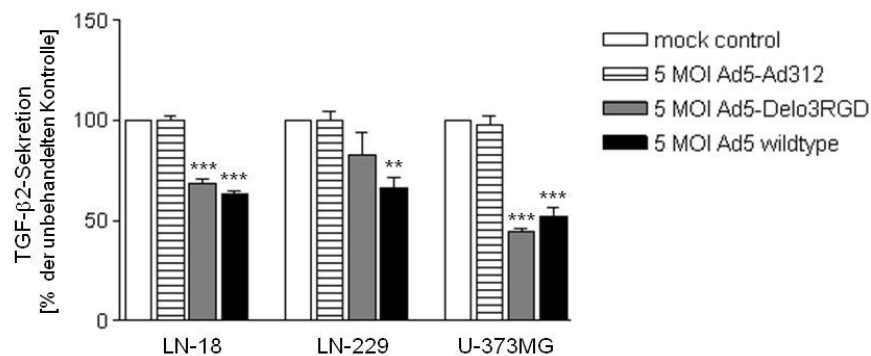


Abb. 16: Inhibition der Sekretion von TGF-β2, nicht aber TGF-β1, in Gliomzelllinien nach viraler Transduktion mit Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt.

Die Sekretion von TGF-β1 und TGF-β2 durch die Glioblastomzelllinien LN-18, LN-229, U-373MG sowie U-87MG ohne Behandlung (A) und nach 72-stündiger Transduktion mit Ad-5wt, Ad5-Delo3RGD und Ad5-Ad312 (B), (C). 24 h Postinfektion erfolgte ein Mediumwechsel, nach weiteren 48 h wurde der Überstand abgenommen, vermessen und auf die Gesamtproteinfärbung mittels Sulforhodamin B bezogen. Signifikanzen: (*) $p < 0,1$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Abb. 16 (C) zeigt die Sekretion von **TGF- β 2** in Gliomzellen nach 72-stündiger Transduktion mit Adenoviren in LN-18, LN-229 und U-373MG. Die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 veränderte die Sekretion dieses Zytokins nicht und übte somit keinen biologischen Effekt aus.

Das bedingt replikationskompetente Ad5-Delo3RGD zeigte dagegen hauptsächlich hoch signifikante Regulationen von TGF- β 2 in den Zelllinien. In LN-18 und U-373MG reduzierte sich die Sekretion deutlich nach adenoviraler Transduktion auf 66 % ($p < 0,001$) bzw. 43 % ($p < 0,001$). In LN-229 induzierte Ad5-Delo3RGD nur eine mäßige (um 16 %) und nicht signifikante Hemmung von TGF- β 2. 72 h Postinfektion hemmte Ad5-wt die TGF- β 2-Sekretion hoch signifikant in LN-18 (59 %; $p < 0,001$), LN-229 (66 %; $p < 0,01$) und U-373MG (52 %; $p < 0,001$).

Das Wildtypvirus zeigte eine hoch signifikante biologische Wirkung in allen drei, das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD in zwei von drei Zelllinien. Beide Adenoviren hemmten die Sekretion von TGF- β 2 in Glioblastomzellen um bis zu 50 - 60 %.

4.5 Messung der Transkriptionsaktivität des TGF- β -Signalwegs nach adenoviraler Transduktion mittels Reporterassays

Auf mRNA (Kapitel 4.3) und Proteinebene (Kapitel 4.4.1) konnte der hemmende Einfluss von Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD auf Faktoren des TGF- β -Signalwegs, insbesondere auf SMAD3, gezeigt werden. Mit Hilfe des Cignal™ Reporter Assay sollte untersucht werden, ob sich die biologischen Effektivitäten der Viren lediglich auf bestimmte Faktoren beschränken oder ob der gesamte Signaltransduktionsweg gehemmt wird. Zu diesem Zweck wurde die SMAD2/SMAD3/SMAD4-spezifische Transkriptionsaktivität als Indikator für den Zustand des TGF- β -Signalweges herangezogen. Da die basale Aktivität für messbare Ergebnisse nicht ausreicht, muss die Signaltransduktion durch die Zugabe von Aktivatoren stimuliert werden. Erst dann kann die Wirkung der Behandlung untersucht werden. In vorangegangenen Sekretionsassays wurde festgestellt, dass die biologischen Aktivitäten der Adenoviren in einer signifikanten Reduktion der TGF- β 2-, nicht jedoch der TGF- β 1-Sekretion resultierten (Kapitel 4.4.2). Die Durchführung der Reporterassays erfolgte unter Stimulation des Signalweges zum einen mittels Zugabe von TGF- β 1 und zum anderen von TGF- β 2.

Die Untersuchung der Transkriptionsaktivitäten des TGF- β -Signalwegs wurde in den Zelllinien LN-18, U-373MG und U-87MG vorgenommen. Bei der Transfektion der Gliomzelllinie LN-229 mit den Luciferase-Plasmid-Konstrukten kam es zu Problemen, die sich nicht durch Änderungen der Zellzahl, Plasmidmenge, Anteil des Transfektionsreagens, Inkubationszeit, Konzentration des Aktivators, etc. beheben liessen.

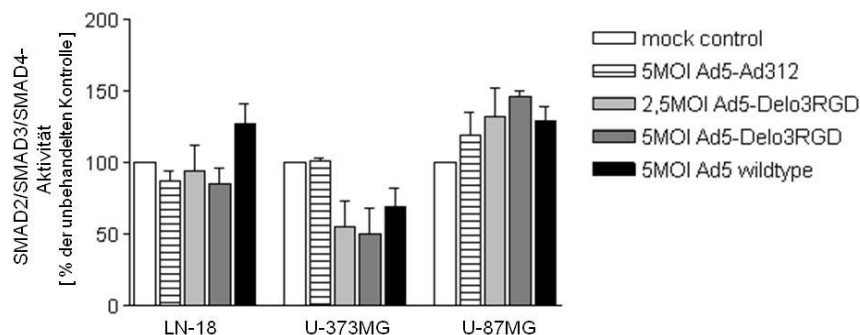
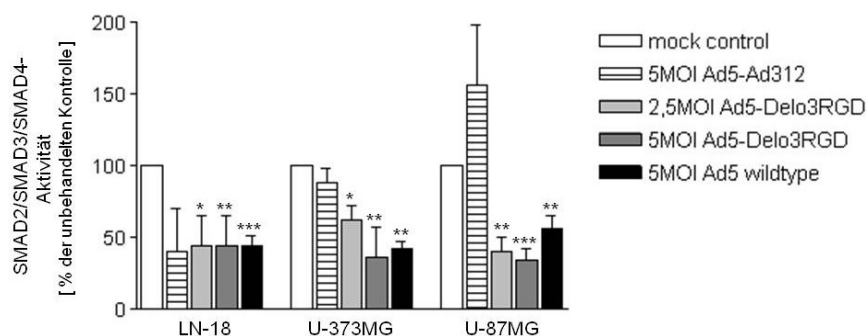
(A) Aktivierung mit TGF- β 1(B) Aktivierung mit TGF- β 2

Abb. 17: Inhibition der Aktivität von SMAD2/SMAD3/SMAD4-Reporterkonstrukten nach viraler Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD bei gleichzeitiger Stimulation durch TGF- β 2.

Aktivierung des Signaltransduktionsweges durch kontinuierliche Stimulation mit TGF- β 1 (A) bzw. TGF- β 2 (B). Parallel erfolgte zunächst die virale Transduktion, nach etwa 48 h die Transfektion mit Reporterkonstrukten. 72 h Postinfektion und 24 h nach Transfektion wurden die Proben geerntet. Die Reporteraktivitäten wurden auf eine interne Kontrolle normalisiert und anschließend auf ein Kontrollkonstrukt bezogen. Die Aktivität der SMAD2/SMAD3/SMAD4-Konstrukte in den unbehandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Signifikanzen: (*) $p < 0,1$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$

Abb. 17 (A) zeigt die SMAD2/SMAD3/SMAD4-spezifische Transkriptionsaktivität nach **Stimulation mit TGF- β 1** und adenoviraler Transduktion. Keine der verwendeten Adenoviren hatte eine signifikante Wirkung auf die Gliomzelllinien. In U-373MG schienen das Wildtypvirus und Ad5-Delo3RGD einen inhibitorischen Effekt auf die Transkriptionsaktivität zu haben. In U-87MG zeigte sich ein gegenteiliger Trend, hier stieg die SMAD-spezifische Aktivität des TGF- β -Signalweges nach der Infektion. Die beobachteten tendenziellen Wirkungen des onkolytischen Virus Ad5-Delo3RGD in LN-18 und U-87MG waren vermeintlich konzentrationsabhängig, wie man im Vergleich von 2,5 MOI und 5 MOI feststellen konnte.

In Abb. 17 (B) ist die SMAD2/SMAD3/SMAD4-spezifische Transkriptionsaktivität nach **Stimulation mit TGF- β 2** und Infektion mit adenoviralen Vektoren dargestellt. Die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 hatte keinen signifikanten biologischen Effekt auf die Glioblastomzelllinien. In U-87MG induzierte Ad5-Ad312 eine Steigerung der Transkriptionsaktivität auf 156 %, die aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Ad5-wt induzierte in allen drei Zelllinien eine drastische und zugleich hoch signifikante Hemmung der SMAD-spezifischen Aktivität um 40 – 60 % ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Eine noch stärkere, konzentrationsabhängige und ebenfalls hoch signifikante biologische Wirkung auf Gliomzellen zeigte sich nach Transduktion mit dem onkolytischen Virus Ad5-Delo3RGD. Die Hälfte der Konzentration von Ad5-Delo3RGD (2,5 MOI) genügte in U-87MG, um eine gleichwertige Hemmung, um 40 – 60 % ($p < 0,1$ bzw. $p < 0,01$), wie durch 5MOI Ad5-wt herbeizuführen. 5 MOI Ad5-Delo3RGD senkte die Transkriptionsaktivität sogar auf 35 % ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$), folglich eine Reduktion um 65 %.

5 Diskussion

In der Gentherapie werden onkolytische Adenoviren genutzt, um im Rahmen der viralen Replikation Tumorzellen zu lysieren. Dabei modifiziert das Virus die zelluläre Genexpression [317,318,319,320,321,322,323]. Die viral induzierten Veränderungen sind abhängig von dem spezifischen adenoviralen Vektor und dem transduzierten Zellsystem. Mit dem Wissen, um die vom Vektor induzierten Veränderungen in den Zielzellen, kann die antineoplastische Aktivität solcher Vektoren erhöht werden. Diese Erkenntnisse können z.B. bei der Auswahl eines möglichen Transgens, der Optimierung des Vektordesigns oder der Auswahl von zu behandelnden Tumorentitäten hilfreich sein.

Zum Zwecke einer Therapie des Glioblastoms wurde durch die AG Holm (Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) das neuartige onkolytische Virus Ad-Delo3RGD entwickelt [202]. Im Pankreas- und Gliommodell konnten bereits potente antineoplastische Effekte beobachtet werden, die in Kombination mit Chemotherapie noch gesteigert werden konnten. Bislang ist jedoch noch nicht bekannt, auf welche Regulationen von zellulären Prozessen die biologische Wirkung des Virus im Gliom zurückzuführen ist und in wieweit zelluläre Faktoren das Ansprechen auf die Ad5-Delo3RGD basierte Therapie bestimmen.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte zu diesem Zweck untersucht werden, welche zellulären Faktoren oder Signalwege durch die Transduktion mit adenoviralen Vektoren unterschiedlicher *E1A*-Statusse, insbesondere von Ad5-Delo3RGD, im Gliommodell beeinflusst werden.

5.1 Generelle Effekte adenoviraler Vektoren auf zelluläre Signalwege

5.1.1 Bewertung der grundlegenden Eigenschaften der verwendeten Adenoviren

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren handelt es sich um *E1A*-wildtyp (Ad5-Wildtyp), *E1A*-mutierte (Ad5-Delo3RGD) und *E1A*-deletierte (Ad5-Ad312) Vektoren. Deren jeweiliger *E1A*-Status wurde nachgewiesen (Abb. 7).

Die frühen adenoviralen Genprodukte sind der Reihe nach hintereinandergeschaltet (*E1A*, *E1B*, *E2*, *E3*, *E4*). Die Replikation von Adenoviren beginnt mit der sofortigen Transkription des *immediate early E1A*-Gens, wodurch die Transkription der weiteren frühen viralen Gene induziert wird [107]. Fehlt die Region ($\Delta E1A$) wird die Expressionskaskade der frühen Gene nicht aktiviert, die Vektoren sind replikationsdefekt. *E1A*-mutierte Adenoviren (Ad5-Delo3RGD) sind dabei ebenso replikationsdefizient wie *E1A*-deletierte (Ad5-Ad312) [212].

Neben dem *E1A*-Status des viralen Genoms wurde die Replikationsfähigkeit der verwendeten Viren mittels Southern Blot-Analyse überprüft (Abb. 8). Das Wildtypvirus und das onkolytische Virus können sich vergleichbar gut auf Gliomzellen, auch bei geringen MOI, replizieren. Ad5-Ad312 hingegen konnte sich nicht replizieren. Die Ergebnisse bestätigten die Daten von Holzmüller *et al.* 2010 [216].

Obwohl *E1A*-mutierte (Ad5-Delo3RGD) und *E1A*-deletierte Adenoviren (Ad5-Ad312) theoretisch replikationsdefizient sein sollten [212], konnte sich das onkolytische Virus in den Gliomzellen replizieren.

Es ist neuerdings bekannt, dass YB-1 eine *E1A-like activity* besitzt, die die Transkription früher viraler Gene induzieren kann [178,214,267]. Im Pankreasmodell konnte anhand von Zytostatika-resistenten Zelllinien gezeigt werden, dass die Replikation von Ad5-Delo3RGD nur in Zellen mit nukleärem YB-1 stattfand. Nachweislich zeigen Glioblastome eine verstärkte Expression von YB-1 [237,324], jedoch ist es in LN-18, U-373MG und U-87MG, vorrangig perinukleär lokalisiert [213]. Demzufolge ist anzunehmen, dass zusätzlich zur nukleären Expression, auch eine Überexpression von YB-1 im Zytoplasma eine Replikation von *E1A*-mutierten Viren begünstigt [202,213,214,215]. Dieser Umstand ist von entscheidender Bedeutung, da vor einem klinischen Einsatz der therapeutischen Viren der Tropismus von Ad5-Delo3RGD eindeutig definiert sein muss. Nur so kann beurteilt werden, ob die Replikation der Vektoren ausschließlich in den Tumorzellen stattfindet und damit deren Einsatz sicher ist.

Das *E1A*-deletierte Ad5-Ad312 benötigt, im Vergleich zu Ad5-Delo3RGD, eine höhere Multiplizität der Infektion (MOI), um sich in Zellen mit erhöhter YB-1-Expression replizieren zu können [214,265]. Grund hierfür ist die Bildung von E1A-12S durch das onkolytische Virus. E1A-12S ermöglicht eine eingeschränkte Aktivierung der viralen Replikation [105,107] indem es u.a. durch die CR1- und CR2-Regionen das Retinoblastomprotein bindet [112]. Zudem kann das verkürzte E1A-Protein die Expression weiterer viraler Faktoren, wie E1B-55K und E4orf6, induzieren [325,326]. E1B-55K und E4orf6 sind in der Folge an der nukleären Translokation von YB-1 beteiligt [178,214,265]. Anschließend aktiviert YB-1 die für die virale Replikation essentiellen *E2*-Gene indem es an den *E2Late* Promotor bindet [178,214,267]. Trotz fehlender *E1A*-Region ist Ad5-Ad312 ebenfalls fähig, eine nukleäre YB-1 Lokalisation zu induzieren, benötigt dafür aber wesentlich höhere MOIs (200 MOI) [178]. Deshalb konnte sich Ad5-Ad312 bei den eingesetzten 10 MOI nachweislich nicht in den Gliomzellen replizieren (Abb. 8).

Obleich sich das onkolytische Virus nahezu ebenso gut in Gliomzellen replizieren konnte wie das Wildtypvirus, war es in der Zelllinie LN-229 lediglich zu einer schwächeren Replikation als Ad5-wt befähigt. Diese Beobachtung könnte auf eine geringere YB-1-Expression in LN-229, im Vergleich zu den anderen verwendeten Zelllinien, hindeuten. Diese Vermutung kann jedoch nur durch weitergehende Untersuchungen, wie beispielsweise Immunfluoreszenzen, bestätigt werden. Die schwächere Replikation von Ad5-Delo3RGD in LN-229 macht auf jeden Fall die Heterogenität von Gliomzellen deutlich, welche ein Merkmal von Glioblastomen sind. Diese Eigenschaft der Tumore führt dazu, dass der therapeutische Nutzen, je nach genetischem Status der Zelle, unterschiedlich groß sein kann. Unabhängig davon ist der YB-1-Status im Gliom ein entscheidender Faktor für die Therapie mit Ad5-Delo3RGD. Nur bei einer Überexpression kann sich das Virus replizieren und infolgedessen die Tumorzelle lysieren.

5.1.2 Einfluss der adenoviralen Vektoren auf allgemeine zelluläre Signalwege

Bislang gibt es im Gliommodell noch keine Studien über den Einfluss der Transduktion von Adenovirus Typ 5, sowie den davon abgeleiteten Vektoren Ad5-Ad312 und Ad5-Delo3RGD auf die zelluläre Genexpression. Zur Charakterisierung der biologischen Interaktionen zwischen Gliomzellen und entsprechenden Adenovirus wurde zunächst die *Microarray*-Technologie genutzt.

Allgemein ließ sich bei der globalen Auswertung der *Microarray*-Daten feststellen, dass etwa 60 % der differenziell regulierten Gene nach viraler Transduktion in ihrer Expression gehemmt wurden (Abb. 9, Abb. 10, Tab. 6), dies geht mit den bisherigen Beobachtungen adenoviraler Infektionen von Ad2 bzw. Ad5 in anderen Zellsystemen konform [327,328]. Grund ist die spezifische Hemmung der zellulären Proteinsynthese in der späten Phase der Infektion, um die viralen Strukturproteine bevorzugt zu bilden. So hemmt E1B-55K/E4orf6 spezifisch den Export zellulärer mRNA ins Zytoplasma, während die Translokation der viralen mRNA weiterhin erfolgt [329,330,331]. Ebenso greift ein Genprodukt von L4 in die virale Genexpression ein, indem es selektiv die Expression zellulärer Transkripte hemmt [332,333,334].

Erstmalig konnte ein Einblick in die Interaktionen zwischen Gliomzellen und Adenovirus Typ 5 und davon abgeleiteten Vektoren gewonnen werden. Im Folgenden sollen nun die allgemeinen Auswirkungen der Transduktion mit dem jeweiligen Virus näher betrachtet werden.

Da **Ad5-Ad312** ($\Delta E1A$), aufgrund seiner Unfähigkeit zur Replikation (Abb. 8, Kapitel 5.1.1), nicht die regulatorischen frühen Gene transkribieren lassen kann, induzierte es nur eine marginale Modifikation der zellulären Genexpression von Gliomzellen.

Bei der Chipanalyse zeigt sich dieser Umstand im Dendrogramm, wo lediglich geringe bis geringste Abweichungen zwischen der unbehandelten Kontrolle einer Zelllinie und den mit Ad5-Ad312 transduzierten Zellen zu erkennen waren (Abb. 9). Weiterhin veranschaulicht Tab. 6, dass die wenigen beobachteten Effekte nur zelllinienspezifisch waren. Bei der Zuordnung der differenziell regulierten Gene zu bestimmten Gengruppen, ergaben sich keine Signalwege, die eine überproportional erhöhte Anzahl regulierter Gene aufwies (Tab. 7). Ad5-Ad312 eignet sich in demnach nicht als onkolytisches Agens gegenüber Gliomzellen, da es nicht in der Lage ist, sich in den Zellen zu replizieren und diese in der Folge zu lysieren.

Die Transduktion von zur Replikation befähigten Vektoren, **Ad5-wt** und **Ad5-Delo3RGD**, induzierte eine massive Modulation der Genexpression in Gliomzellen. Diese äußerte sich in einer hohen Anzahl differenziell exprimierter Gene, wobei Ad5-Delo3RGD einen sehr ähnlichen biologischen Effekt auf Gliomzellen zeigte wie das Wildtypvirus.

Vom Wildtypvirus unterscheidet sich das onkolytische Virus u.a. durch die Einführung eines RGD-Motivs in das Fiberprotein. Damit ist dessen die Infektion nicht mehr CAR-abhängig. Zusätzlich gibt es noch weitere Unterschiede, wie die Deletion des starken Aktivators der viralen Transkription, *E1A-13S*,

sowie die Deletion des antiapoptotischen *E1B-19K* und der *E3*-Region, welche an der Modulation der antiviralen Abwehr, sowie der Freisetzung der viralen Partikel beteiligt ist [202].

Das onkolytische und das Wildtypvirus zeigten in der globalen Expressionsanalyse eine gleichsam hohe regulative Wirkung auf zelluläre Faktoren, gemessen an der Anzahl der differenziell exprimierten Gene. Dabei hatten Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD auf etwa 5.900 bzw. 5.400 Gene einen biologischen Effekt. Das ist ein massiver Einfluss auf die Wirtszelle, was sich im Genexpression-Verzeichnisbaum (Abb. 9) in einem deutlichen Unterschied der Expressionsprofile zwischen unbehandelter Kontrolle und korrespondierender Ad5-wt bzw. Ad5-Delo3RGD infizierter Probe zeigte.

Neben der Anzahl der regulierten Gene hatten die Vektoren zudem einen sehr ähnlichen Einfluss auf die Genexpression der Wirtszellen. Dies wurde einerseits deutlich, wenn man die ähnlichen Expressionsmuster im Dendrogramm (Abb. 9) einer Zelllinien betrachtete, die mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD behandelt wurden. Desweiteren zeigten die Schnittmengendiagramme (Abb. 10), dass die (bedingt) replikationskompetenten Viren große Schnittmengen gemeinsam regulierter Gene aufwiesen. Das bedeutet, dass Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD Einfluss auf die gleichen Faktoren innerhalb einer Zelllinie nahmen. Die Größe des Einflusses unterschied sich von Zelllinie zu Zelllinie und umfasste mehrere hundert bis tausend Gene. Im Gegensatz zur Ad5-Ad312 waren die Regulationen jedoch nicht nur zelllinienspezifisch, sondern z.T. gliomspezifisch. Dies zeigte sich in den Schnittmengenanalysen (Tab. 6), welche die gemeinsamen Regulationen von mehreren hundert Genen durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD in mehreren Zelllinien gleichzeitig verdeutlicht.

Weitere Untersuchungen sollten die spezifischen funktionellen Gengruppen identifizieren, die durch die Wechselwirkung zwischen Vektor und Zielzelle beeinflusst wurden. Hierzu erfolgte eine Analyse der Schnittmengen hinsichtlich einer gehäuften Regulation von Genen, die einem bestimmten Signalweg zugehörig sind (Tab. 7). Die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 zeigte keine auffällige Häufung von beeinflussten Genen, die einer spezifischen Gengruppe zugehörig waren. Als Grund dafür muss der geringe Einfluss von Ad5-Ad312 auf die zelluläre Genexpression angesehen werden. Das Wildtypvirus hingegen regulierte tendenziell einige wenige Gene mehr als das onkolytische Virus, prinzipiell beeinflussten aber beide Viren die gleichen zellulären Signalwege, wie den Wnt-Signalweg, Apoptose bzw. E2F-assoziierte Faktoren und den TGF- β -Signalweg. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beleg für die ähnliche biologische Wirkung des Wildtypvirus und Ad5-Delo3RGD auf Gliomzellen.

Trotz der Deletion von *E1A-13S*, wodurch das onkolytische Virus auf YB-1-negativen Zellen replikationsdefizient ist, stellten die Glioblastomzellen hinreichende Bedingungen für eine Wildtyp-ähnliche Replikation. Und in der Folge zeigte sich ein ähnlicher Einfluss von Ad5-Delo3RGD auf die Genexpression von Gliomzellen, wie durch das Wildtypvirus. Anscheinend wurden v.a. Signalwege reguliert die an der zellulären Abwehr und der Proliferation beteiligt sind. In wieweit diese Modulationen ein Bestandteil der antineoplastischen Wirkung ausmachen und damit eine Relevanz in der Therapie mit Ad5-Delo3RGD spielen, musste durch die Betrachtung der einzelnen zellulären Faktoren und die Art ihrer viralen Regulation geklärt werden.

5.1.2.1 E2F-Targetgene

Wie zu erwarten war, wurde durch die *Gene Set Enrichment*-Analyse festgestellt, dass die Gruppe der E2F-Targetgene überproportional viele Gene aufwies, die durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD differenziell reguliert wurden (Tab. 8). Bekanntermaßen reguliert E1A indirekt die Genexpression von E2F-Targetgenen [335]. Dazu bindet E1A an den Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (Rb) und setzt infolgedessen den Transkriptionsfaktor E2F frei, welcher wiederum die Expression von Genen aktiviert, die eine Transition in die Synthesephase begünstigen [336,337].

Die meisten differenziell regulierten Faktoren dieser Gengruppe sind involviert in DNA-Metabolismus, Zellzyklus und Transkription. In der *Microarray*-Analyse wurde nahezu die Hälfte der differenziell regulierten E2F-Targetgene verstärkt exprimiert. Diese Beobachtung findet sich in bisherigen Veröffentlichungen über den Einfluss von Adenoviren in anderen Zellsystemen wieder [328,338]. Ad5-wt induzierte eine verstärkte Expression von 8 und Ad5-Delo3RGD von 4 Faktoren. Jedoch wurden die meisten Gene in ihrer Expression gehemmt. In der globalen Expressionsanalyse hemmte das onkolytische Virus 5, das Wildtypvirus sogar 11 E2F-Targetgene, wobei die Ergebnisse für ausgewählte Gene mittels *real-time* RT-PCR vorrangig bestätigt werden konnten (Tab. 11). Beide Viren nahmen dabei Einfluss auf unterschiedliche Gene. Die E1A-Deletante Ad5-Ad312 hatte, aufgrund ihrer Replikationsinkompetenz, keinen Einfluss auf die Expression ausgewählter E2F-Faktoren.

Der Grund für die maßgeblich reduzierte Expression der E2F-Targetgene ist der späte Isolationszeitpunkt, da sich die Zellen 48 bzw. 72 Stunden nach Infektion in der späten Phase des Infektionszyklus befinden. Mit Beginn der viralen DNA-Synthese wechselt die Transkription in die späte Phase, die mit der Transkription der späten viralen Gene einhergeht. Die Modulation, vorrangig verstärkte Expression, der E2F kontrollierten Gene findet hauptsächlich in der frühen Phase, 24 bis 48 hpi, statt und reduziert sich dann kontinuierlich. Dabei werden einige Gene nur transient differenziell reguliert, andere werden zunächst verstärkt und anschließend vermindert transkribiert [328].

Die Gruppe der E2F-Targetgene war die Gruppe mit den größten Unterschieden zwischen Wildtyp- und onkolytischen Virus. So regulierte das onkolytische Virus 9 Gene, das Wildtypvirus hingegen 19 Zielgene von E2F. Der Unterschied ist auf die E1A-13S Deletion des Ad5-Delo3RGD zurückzuführen. Der Einfluss der verschiedenen Vektoren auf E2F-Targetgene unterstützt die gewonnene Datenlage aus der Southern Blot-Analyse zur Replikationsfähigkeit. Das Wildtypvirus konnte sich erwartungsgemäß gut in Gliomzellen replizieren, da es u.a. fähig ist, die Expression der E2F-Targetgene so zu modulieren, dass die Zelle in die Synthesephase übergeht. In der S-Phase liegen die optimalen Bedingungen für die Virusreplikation vor.

Ad5-Ad312 konnte, aufgrund der fehlenden viralen Proteine, die E2F-Targetgene nicht beeinflussen. Dadurch war das Virus nicht in der Lage sich in Gliomzellen zu replizieren. Eine komplette Deletion

des *E1A*-Gens (Ad5-Ad312) schließt folglich eine virale Replikation in Gliomzellen, zumindest bei moderaten Viruskonzentrationen, aus.

Das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD konnte die Expression der E2F-Targetgene verändern. Der Einfluss war jedoch nicht so groß, wie beim Wildtypvirus. Die Gliomzellen stellten, aufgrund ihrer Überexpression von YB-1 eine Substitution für E1A-13S bereit, wodurch das Protein nicht essentiell für die virale Replikation in Gliomzellen war, sofern E1A-12S gebildet wurde. Das virale E1A-12S ist demnach essentiell für die virale Replikation im Gliom, welche selbst bei moderaten bis niedrigen Viruskonzentrationen stattfand.

5.1.2.2 Apoptose-assoziierte Gene

Es ist anzunehmen, dass sich die Regulationen von Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD, aufgrund ihrer genetischen Unterschiede unterscheiden. Im *Microarray*-Experiment regulierte das onkolytische Virus 15 Apoptose-assoziierte Gene, das Wildtypvirus hingegen 20 (Tab. 7). In der *real-time* RT-PCR konnten die Daten beispielhaft für 4 proapoptotische (BNIP3L, FADD, JUN, NFKBIA) und 2 antiapoptotische (BCL2L1, MCL1) Gene größtenteils nicht bestätigt werden, was vermutlich auf die experimentellen Unterschiede zurückzuführen ist. Grundsätzlich muss für die Diskussion aller *Microarray*-Ergebnisse angemerkt werden, dass die Isolationen der verschiedenen Versuchsbedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nach 48 oder 72 Stunden, stattfanden. Dies kann zu einer Verzerrung der Resultate führen. Desweiteren stellt die Chip-Analyse nur ein Einzelexperiment dar, welches nicht wiederholt wurde. Aus diesem Grund war es umso wichtiger bei der Analyse der Daten auf generelle Tendenzen in den Regulationen von Faktoren bzw. in Gengruppen von Signalwegen zu achten.

Die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 hatte weder in der Chip-Analyse noch in der *real-time* RT-PCR einen regulativen Einfluss auf die Apoptose-assoziierten Gene.

Prinzipiell induzierten Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD apoptotische und antiapoptotische Prozesse in der Wirtszelle (Tab. 9). Zum einen indem die Expression von proapoptotischen Genen gefördert und von antiapoptotischen Genen gehemmt wurde bzw. umgekehrt.

In den vorgenommenen Experimenten konnte ein Vergleich zwischen Ad5-Wildtypvirus und *E1A*-mutierten/*E3*-deletiertem-Virus (Ad5-Delo3RGD) angestellt werden. Aufgrund des Unterschieds in der genetischen Ausstattung der Vektoren, war mit einer unterschiedlichen Beeinflussung der Apoptose-assoziierten Faktoren zu rechnen. Zum einen fehlt dem onkolytischen Virus ein Apoptose-Hemmer, das BCL2-Homolog E1B-19K [114], sowie E3, welches ebenfalls an der Modulation der Immunantwort beteiligt ist [127,128,129,130,131,132,133]. Demnach war zu erwarten, dass Ad5-Delo3RGD, im Vergleich zum Wildtypvirus, weniger kompetent in der Hemmung proapoptotischer Prozesse ist. Überraschenderweise führte aber die Transduktion mit Ad5-wt zu einer verstärkten Förderung der proapoptotischer Prozesse, indem mehr proapoptotische Gene induziert wurden. Dieser Umstand lässt sich mit dem späten Isolationszeitpunkt erklären. In dieser Phase der Replikation induziert das Virus

selbst proapoptische Prozesse, die zur Zelllyse führen. An diesen Prozessen ist u.a. E3 beteiligt [129,140]. Prinzipiell ist es sehr schwierig zwischen antiviraler Antwort und virusinduzierter Veränderung zu unterscheiden. Die Regulation der Apoptose in einer infizierten Wirtszelle ist ein sehr komplexer Vorgang, der von vielen Faktoren abhängig ist. Dazu gehören u.a. die Konzentration der eingesetzten Viren, die virale Replikationsphase zum Untersuchungszeitpunkt, die Effektivität der antiviralen Abwehr der Wirtszelle, das Zellsystem, sowie die genetische Ausstattung an Apoptose-regulierenden Genen des Virus.

Dennoch, waren die durch Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD induzierten Unterschiede in der Expression von Apoptose-Faktoren lediglich gering. Die Regulation dieser Faktoren ist ein Hinweis auf eine geringfügig effektivere Lyse durch das Wildtypvirus im Vergleich mit dem sich in YB-1 positiven Zellen replizierenden onkolytischen Virus.

5.2 Einflussnahme auf die Expression potentieller Targetgene von miRNAs

MicroRNAs (miRNA, miR) gehören zur Gruppe der nicht kodierenden Ribonukleinsäuren und sind zwischen 21 und 23 Nukleotide lang. Im Bereich der Gliomforschung gibt es bereits erste Erkenntnisse über die Beteiligung von miRNAs an der Tumorprogression und Tumorgenese [1,2,3,4,5,6,312]. Weniger Beachtung fand das Thema der Regulation zellulärer miRNAs nach adenoviraler Transduktion, obwohl bisherige Veröffentlichungen zunehmend auf die Bedeutung von microRNAs als Tumorsuppressor oder Onkogene hinweisen [339,340,341,342,343]. Die Vermutung ist naheliegend, dass Adenoviren während ihrer Replikation in Wirtszellen, neben der Expression von zellulären Genen, ebenfalls die Expression zellulärer miRNAs regulieren. Wenn es sich hierbei um microRNAs handelt, deren Expression spezifisch (krankheitsbedingt) im Gliom verändert sind, kann der viralen Gentherapie ein Nutzen daraus entstehen. So könnte ein Transgen die therapeutischen Effekte verstärken. Beispielsweise indem eine induzierte Expressionsänderung zur Apoptose der Tumorzellen führt. Dabei kann die Expressionsänderung entweder durch die Insertion entsprechender microRNA oder anti-microRNA herbeigeführt werden oder durch die virale Replikation selbst.

Aus den eben dargelegten Gründen wurden die *Microarray*-Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit einer *in silico*-Analyse zugeführt. Die Suche nach 3'UTR-Bindemotive für microRNAs in den differenziell exprimierten Genen sollte der Identifizierung potentiell regulierter miRNA dienen.

Wie zu erwarten war, zeigte Ad5-Ad312 keinen Einfluss auf die Expression von microRNAs, da das Virus zu keiner Replikation in den Gliomzellen fähig war. Ad5-Wildtyp bzw. Ad5-Delo3RGD beeinflussten die Expression von 8 miRNAs (MIR-15, MIR-25, MIR-92, MIR-124, MIR-128, MIR-181, MIR-182 und MIR-195) (Tab. 10). Die Mehrzahl der potentiellen Targetgene der microRNAs wurde in ihrer Expression gehemmt. Im Umkehrschluss ist die Hemmung der Targetgene ein Indikator für **eine Expressionssteigerung der entsprechenden microRNA**.

In der Auswertung der 3'UTR-Analyse wurde der Fokus auf zwei Aspekte gelegt. Zum einen, ob die potentiell regulierten miRNAs in der Tumorgenese bzw. Progression von Gliomen oder anderen Tumoren beteiligt sind. Zum anderen, ob die microRNAs bislang in Verbindung mit einer Regulation durch Adenoviren gebracht wurden.

Um eine definitive Aussage über die Regulation spezieller miRNAs zu machen, müsste zumindest ein direkter Nachweis über die verstärkte oder verminderte Bildung der miRNA selbst erfolgen. Insbesondere ist dies wichtig, wenn ein Bindemotiv mehreren miRNAs zugeordnet werden kann, um zu beurteilen, ob ein ganzer miRNA-Cluster oder nur eine spezifische microRNA reguliert wird.

5.2.1.1 Zelluläre miRNAs und deren Regulation durch Adenoviren

Nur wenige Untersuchungen wurden bislang angestrengt um miRNAs zu identifizieren, die durch die Expression viraler Gene differenziell exprimiert werden. Dabei müssen zwei virale Regulationsmechanismen unterschieden werden. Zum einen die unspezifische Hemmung von miRNA mittels adenoviraler Virus-assoziiierter RNA (VA RNA) durch direkte Bindung der zellulären Dicer, sowie durch Inhibition des nukleären Transport von pre-miRNA [344]. Der zweite Mechanismus betrifft die Regulation von miRNA durch adenovirale Genprodukte, z.B. der frühen (*Early*) Gene.

In vereinzelt Untersuchungen konnten bislang microRNAs identifiziert werden, deren Targetgene durch adenovirale Produkte reguliert wurden. Bislang gibt es jedoch keine veröffentlichten Daten über den Einfluss von Adenovirus Typ 5 auf die miRNA-Expression in Gliomzellen. Deshalb ist der Vergleich der hier erbrachten Ergebnisse nur mit Studien möglich, die in anderen Zellsystemen nach Transduktion mit Adenovirus Typ 3 [301] bzw. Transfektion des adenoviralen E1A [308] erhoben wurden. Es ist davon auszugehen, dass zusätzliche oder verschiedenartige Einflüsse durch weitere virale Proteine neben E1A bzw. durch Unterschiede zwischen den Serotypen und Zellsystemen bestehen. Dessen ungeachtet finden sich einige der in den Studien identifizierten differenziell regulierten microRNAs ebenfalls in der *in silico*-Analyse der mit Ad5-wt bzw. Ad5-Delo3RGD infizierten Gliomzellen wieder. Dies betrifft die microRNAs, MIR-15B, MIR-25, MIR-92, MIR-182, und MIR-195 [301,308]. Darausfolgend kann man erwarten, dass es sich bei der in dieser Arbeit beobachteten Überexpression von **MIR-15B**, **MIR-25**, **MIR-92**, **MIR-182**, und **MIR-195** nach adenoviraler Transduktion um allgemeine Regulationen durch Adenoviren handelt. Diese allgemeinen adenoviralen Regulationen könnten in Tumoren mit entsprechender miRNA-Expression die antitumorale Aktivität der Vektoren erhöhen. Vorrausgesetzt die entsprechenden miRNAs spielen eine wesentliche Rolle in grundlegenden zellulären Vorgängen, wie beispielsweise Proliferation, Apoptose oder Resistenzverhalten. Deshalb wäre es lohnend, bei der Auswahl der zu behandelnden Tumore, die zelluläre microRNA-Expression mit einzubeziehen. Die eingehende Analyse der Expressionsmuster kann zudem einer weiteren Verwendung zugeführt werden. So gibt es bereits Untersuchungen miRNA-Expressionsmuster von Geweben für die Verbesserung des viralen Tropismus zu nutzen. Beispielsweise konnte ein bedingt replikationskompetenter Adenovirus entwickelt werden, der sich spezifisch nicht in Leberzellen replizieren kann [345].

5.2.1.2 Regulation zellulärer miRNAs, die in Zusammenhang mit humanen Tumoren stehen

Die Transduktion mit Ad5-wildtyp und Ad5-Delo3RGD führte zu einer gesteigerten Expression von miRNAs. Einige microRNAs sind bereits mit einer verstärkten (MIR-182, MIR-195 und MIR-15) [305,311,312] oder verminderten (MIR-128, MIR-124, MIR-181) Expression im Gliom beschrieben [1,2,3,4,5,6]. Inwieweit die Regulation der microRNAs eine Relevanz in der Virotherapie mit Ad5-Delo3RGD spielen könnten, indem sie etwa einen Beitrag zur antitumoralen Aktivität der Vektoren leisten, musste durch eine genauere Betrachtung der miRNAs und ihrer Rolle im Gliom festgestellt werden. Zuerst sollen die microRNAs **MIR-182, MIR-195 und MIR-15**, die mit einer **verstärkten Expression im Gliom assoziiert** sind, betrachtet werden. Inwieweit die durch adenovirale Infektion ausgelöste zusätzliche positive Regulation von miRNAs, die eine verstärkte Expression im Gliom aufweisen, einen positiven Effekt auf den therapeutischen Nutzen hat, ist fragwürdig.

Da sich nach adenoviraler Transduktion hauptsächlich Expressionssteigerungen der miRNAs feststellen liessen, sind für den therapeutischen Nutzen vorrangig miRNAs mit einer **verminderten Expression im Gliom** interessant, wie die microRNAs **MIR-128** [1,2,3], **MIR-124** [4] und **MIR-181** [1,5,6]. Die verminderte Expression geht wiederum mit einer verstärkten Proliferation einher. Eine Induktion von microRNAs durch den therapeutischen Einsatz von Adenoviren, die normalerweise im Gliom negativ reguliert sind, kann der antineoplastischen Wirkung der Vektoren nur förderlich sein. Besonders interessant ist die Regulation von MIR-181. Hierbei handelt es sich um einen Tumorsuppressor, dessen Expression negativ korreliert ist mit der des antiapoptotischen BCL2 [8]. Die Überexpression der microRNA im Gliom und bei Lungenkrebs resultiert in einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung [9] und Chemotherapeutika [7,8]. Der Zusammenhang zwischen Resistenzen und MIR-181 ist somit ein neuer Erklärungsansatz für die Steigerung antineoplastischer Effizienzen der verwendeten Viren durch die Kombination mit konventionellen Therapien. Somit könnte die gesteigerte Expression von MIR-181, neben der viralen Zweckentfremdung von YB-1 (*Mutually Synergistic Therapy*-Modell: *MUST*-Modell) [265], ein weiterer Mechanismus sein, Zellen gegenüber Zytostatika und Bestrahlung zu sensitivieren. Das *MUST*-Modell beschreibt die nukleären Translokation von YB-1, aufgrund einer Behandlung mit Zytostatika oder Bestrahlung [218,224], infolgedessen es zu einer Replikation der Adenoviren kommt. Weil YB-1 scheinbar an der DNA-Reparatur beteiligt ist [220,238,346,347,348], ist angesichts seiner viralen Verwendung eine effektive Aufrechterhaltung der zellulären Resistenz nicht länger möglich.

Neben seiner Rolle in der Sensitivierung gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika, ist ein weiterer interessanter Aspekt von MIR-181, die Beobachtung von Shi *et al.*, dass die Expression von MIR-181 im Gliom Apoptose induzieren kann [5]. Allein eine Expressionssteigerung der microRNA könnte also schon zu einer Induktion der Apoptose in den Tumorzellen führen. Dies gilt zumindest für das Gliommodell. Bei Pankreaskarzinomzellen führte die Kombination mit Zytostatikum Temozolomid und Ad5-Delo3RGD zu einer geringeren Steigerung des onkolytischen Effekts [202]. Wohingegen Holzmüller *et al.* 2010 zeigten, dass die Kombinationstherapie im Xenograft-Gliom-Mausmodell in

über 30 % der Fälle zu einer kompletten Tumorregression führte [216]. Das könnte ein Hinweis auf die Beschränktheit auf das Gliommodell sein, aufgrund der relevant verminderten Expression von MIR-181. Somit ist MIR-181 ein gewichtiger Faktor bei der Ad5-Delo3RGD-basierten Therapie. Ist die Expression der microRNA im zu behandelnden Tumor erniedrigt, führt nach bisherigen Erkenntnissen eine Kombinationstherapie aus Ad5-Delo3RGD und Zytostatika bzw. Bestrahlung zu einer wesentlichen Steigerung der antineoplastischen Wirkung. Vermutlich könnte darüberhinaus die Wirkung durch eine zusätzliche Insertion von MIR-181 als Transgen nochmals gesteigert werden.

5.3 Einfluss auf den Wnt-Signalweg und Hemmung des Angiogenesefaktors VEGF

Bei der Identifikation von Gengruppen, bei denen überproportional viele Gene differenziell reguliert wurden, konnte dem Wnt-Signalweg die höchste Anzahl an regulierten Genen durch das Adenovirus Typ 5 (22 Gene) bzw. das onkolytische Virus (20 Gene) zugeordnet werden. Es wurde somit angenommen, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass die Viren einen Einfluss auf diesen Signalweg ausüben. Zumal bereits für andere Viren, wie dem humanen Polyomavirus JC (JCV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) beschrieben wurde, dass sie den Wnt-Signalweg regulieren können [349,350,351]. Desweiteren wurde für das Adenovirus Typ 2 eine Regulation von Wnt-assoziierten Faktoren in humanen primären Lungenfibroblasten auf mRNA-Level gezeigt [328]. Der Wnt-Signalweg ist u.a. an der Zellproliferation beteiligt, welche im Infektionszyklus von Adenoviren eine substantielle Rolle spielt (siehe Kapitel 5.1.2).

Die globale Expressionsanalyse zeigte für Ad5-Ad312 keine Regulationen. Das Wildtypvirus und das onkolytische Virus hatten jedoch eine vornehmliche hemmende Wirkung auf Wnt-Faktoren, wie Inhibitoren, Aktivatoren, Rezeptoren und Targetgene (Abb. 11). Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD beeinflussten dabei die gleichen Gengruppen und Faktoren. Bei der Validierung der Ergebnisse durch die *real-time* RT-PCR konnten die Daten für Ad5-Delo3RGD bestätigt werden, jedoch nicht für Ad5-wt. Zusätzlich zeigte das onkolytische Virus in zwei der vier Zelllinien eine Reprimierung von β -Catenin, einem Schlüsselprotein der Wnt-Signaltransduktion (Tab. 13). Auf Proteinebene konnte jedoch weder eine veränderte Proteinexpression (Abb. 13) noch Phosphorylierung (nicht gezeigt) von β -Catenin nach adenoviraler Transduktion festgestellt werden. Dieser Umstand ist ein starkes Indiz dafür, dass die auf Genebene beobachtete Hemmung keinen Einfluss auf Proteinebene hatte. Desweiteren bestanden die bei JCV, KSHV und EBV beobachteten Regulationen in einer Stabilisierung von β -Catenin und damit in einer Aktivierung des Wnt-Signalweges [349,350,351]. Die Regulationen durch das Adenovirus Typ 2 waren weniger eindeutig, da aktivierende und hemmende Prozesse des Wnt-Signalweges induziert wurden. [328]. Als Schlußfolgerung ergibt sich somit, dass eventuelle biologische Effekte durch adenovirale Transduktion von Wildtyp- bzw. onkolytischen Virus auf den Wnt-Signalweg in Gliomzellen nur auf Gen- jedoch nicht auf Proteinexpressionsebene stattfanden. Der Wnt-Signalweg spielt folglich keine übergeordnete Rolle und hat keinen Einfluss auf den Therapieerfolg in Gliomzellen.

Bei der Untersuchung des Signalweges, wurde auch das Zielgen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) untersucht. Dieses zeigte in der *Microarray*-Untersuchung eine Hemmung durch das Wildtypvirus und das onkolytische Virus, wohingegen in der *real-time* RT-PCR lediglich für letzteres eine starke Reprimierung des Faktors gemessen wurde. Deshalb sollte untersucht werden, ob VEGF direkt und somit unabhängig vom Wnt-Signalweg beeinflusst wird.

5.3.1.1 Virale Regulationen des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)

Bei der Vermessung der VEGF-Genexpression und -Sekretion wurde die Isoform VEGF-A₁₆₅ bestimmt. VEGF-A stellt die wesentliche Ursache für die verstärkte pathologische Neubildung von Gefäßen dar [352,353]. Im weiteren Verlauf wird VEGF-A lediglich als VEGF bezeichnet. Unter hypoxischen Bedingungen fördert der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF) die VEGF-Expression [354]. Da Glioblastomzellen unter normoxischen Bedingungen aber ebenfalls hohe Level an VEGF exprimieren liegt die Vermutung nahe, dass noch andere Faktoren oder Mechanismen existieren, die, unabhängig von der Mikroumgebung, zu einer verstärkten Expression von VEGF führen [355].

Die VEGF-Sekretion in Glioblastomzelllinien fiel sehr unterschiedlich aus (Abb. 15 (A)). LN-299 sekretierte kein VEGF, wohingegen U-87MG sehr hohe Mengen (56.000 pg/mL) abgab. Im Vergleich dazu hatten LN-18 (14.700 pg/mL) und U-373MG (18.000 pg/mL) eine mehr als dreifach niedrigere Sekretion.

Nach viraler Transduktion zeigte die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312 keinen Effekt auf die VEGF-Sekretion in LN-18 und U-87MG, induzierte aber in U-373MG eine Steigerung der Sekretion. Dagegen erfolgte in zwei der getesteten Zelllinien nach viraler Transduktion mit dem Wildtypvirus bzw. onkolytischen Virus eine hoch signifikante Hemmung der VEGF-Sekretion um 40 - 60 %. Bei der stark VEGF-sekretierenden Zelllinie U-87MG konnte eine geringere Hemmung um 25 % für Ad5-wt und 23 % für Ad5-Delo3RGD beobachtet werden, wohingegen letztere nicht signifikant war. Somit scheint die Reprimierung von VEGF abhängig vom *E1A*-Status zu sein, da *E1A*-wildtyp und *E1A*-mutierte Vektoren nicht nur die Expression, sondern auch die Sekretierung des Angiogenesefaktors hemmten. Dagegen hatte das *E1A*-deletierte Virus keinen Einfluss auf die Expression und Sekretion, bzw. schien vereinzelt einen gegenteiligen Effekt zu induzieren.

Die biologische Wirkung von Wildtyp und insbesondere Ad5-Delo3RGD ist eine sehr bedeutsame Folge der viralen Replikation, angesichts der hohen klinische Relevanz von VEGF im Glioblastom. Die pathologische Vaskularisierung im Glioblastom im Vergleich mit anderen soliden Tumoren ist stark ausgeprägt und deshalb auch ein Kriterium für die Zuordnung des Dignitätsgrades [10,11,356,357]. Dabei korreliert die Neovaskularisation mit dem Grad der Malignität, der biologischen Aggressivität und der Rezidivbildung bzw. ist negativ korreliert mit dem postoperativen Überleben [10,11,12,13].

Dass die gemessenen Auswirkungen ebenfalls *in vivo* ihre Wirksamkeit zeigen, ist sehr wahrscheinlich. Verschiedene Studien zeigen, dass die Hemmung von VEGF das Wachstum der Gliomzellen hemmt und eine Rückbildung der Blutgefäße induziert [25,216].

Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, wie E1A die Expression von VEGF hemmt. Die Wirkung scheint jedoch auf zwei unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein. Der Hypoxie-abhängige Weg basiert auf der Bindung von E1A an p300/CBP, was in einer Hemmung der HIF-1 α -vermittelten Transkription von VEGF resultiert [358,359]. Der Hypoxie-unabhängige Mechanismus ist bislang nicht vollständig entschlüsselt worden. Es wurde lediglich beobachtet, dass die E1A-Expression in einigen Zelllinien ebenso unter normoxischen Bedingungen negativ mit dem VEGF-Level korreliert ist [358,360].

Grundsätzlich sind die hemmenden Effekte des onkolytischen Virus auf die wesentliche Ursache pathologischer Neovaskularisation, VEGF-A, nicht nur wünschenswert, sondern sind höchstwahrscheinlich auch Bestandteil der antineoplastischen Wirkung. Dies gilt insbesondere im Gliom, da VEGF in diesen Tumoren eine wichtige Rolle spielt.

Trotz der Deletion in der E1A-Genregion, waren die Effekte des onkolytischen Virus ähnlich groß, wie die des Wildtypvirus. Folglich war E1A-12S-Protein ausreichend für die inhibitorische Wirkung auf VEGF. Der Angiogenese-Faktor ist demnach von hoher Relevanz bei der Beurteilung des Ansprechens auf eine Ad5-Delo3RGD-basierten Therapie. Bei der Auswahl neuer Anwendungsgebiete von Ad5-Delo3RGD sollten demnach Tumore, in denen VEGF eine wesentliche Rolle spielt, bevorzugt untersucht werden.

5.3.1.2 Virale anti-Angiogenese-Therapie und weitere therapeutische Anwendungen

Durch die Spezifität des Virus für Gliomzellen ist eine gezielte anti-Angiogenese-Therapie, die evtl. bereits bestehende Therapien unterstützen könnte, möglich. Dadurch könnten je nach kombiniertem Therapieverfahren höchstwahrscheinlich niedrigere Konzentration und damit geringe Nebenwirkungen bzw. bessere Behandlungserfolge erzielt werden.

Es gibt bereits einige Studien, die belegen, dass die Kombination von viraler Gentherapie mit Bestrahlung oder Zytostatika eine wesentlich bessere Wirkung erzielt [167,202,213,215,216,361,362]. Das *Mutually Synergistic Therapy*-Modell skizziert dabei den Mechanismus der Interaktionen zwischen Virotherapie und Chemotherapie bzw. Bestrahlung [265].

Mit dem Wissen um die inhibitorische Wirkung von E1A-mutierten Viren auf VEGF kann man annehmen, dass die biologischen Effekte sich, zumindest z.T., ähnlich auswirken wie bei anderen anti-VEGF-Therapien. So resultiert die Behandlung mit Bevacizumab (Avastin®), einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF, in einer veränderten Vaskularisierung und verringertem interstitiellen Druck im Tumor [363,364], in dessen Folge vermutlich eine bessere Erreichbarkeit der Tumorzellen durch die Chemotherapie erzielt wird [365,366]. Damit bieten die inhibitorischen Effekte auf VEGF durch das Wildtypvirus bzw. Ad5-Delo3RGD zumindest in Teilen eine Erklärung für die verstärkten antitumoralen Effekte bei der Kombination mit Chemotherapie. Demzufolge wäre es sinnvoll das *MUST*-Modell ebenfalls um den Faktor VEGF zu erweitern.

Gegebenenfalls hat daneben die Kombination von Viro- und Chemotherapie einen größeren Nutzen bei geringen Nebenwirkungen als die Kombination von Chemotherapie und Bevacizumab (Avastin®), welche mit z.T. erheblichen Nebenwirkungen (u.a. Bluthochdruck, Blutungen, Darm-Perforation [367], Blutgerinnsel, Blutbildungsstörungen, langsame Wundheilung [368]) behaftet ist.

5.4 Inhibition des TGF- β -Signalwegs

Eine weitere Gruppe der Signaltransduktionswege, die nach der bioinformatischen Auswertung des *Microarrays* eine auffällig konzentrierte differenzielle Expression von Genen aufwies, war der TGF- β -Signalweg. Der Signalweg reguliert eine Vielzahl an zellulären Prozessen, wie die Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose indem es die Transkription von Targetgenen kontrolliert [369,370,371,372,373,374].

5.4.1.1 E1A induziert Hemmung des TGF- β -Signalwegs in Glioblastomzellen

In den mRNA-Expressionsanalysen zeigten das Wildtypvirus, sowie das onkolytische Ad5-Delo3RGD (Kapitel 4.2.2 und 4.3) v.a. eine Hemmung von Signalweg assoziierten Faktoren. Zu diesen Faktoren gehörten u.a. Signalmoleküle, an der Signalweiterleitung assoziierte Gene, Antagonisten, Targetgene und der Transkriptionsfaktor SMAD3. Bei der Validierung der *Microarray*-Daten mittels *real-time* RT-PCR konnte der vornehmlich hemmende Einfluss des Wildtypvirus und von Ad5-Delo3RGD auf ausgewählte Gene des TGF- β -Signalwegs bestätigt werden. Die E1A-Deletante Ad5-Ad312 zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Signalweg assoziierten Faktoren.

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass das adenovirale E1A wachstumsstimulierende und –hemmende Signale von TGF- β interferiert [375], indem es die Expression von Rezeptoren [376,377] oder Inhibitoren reguliert [378]. Die maßgeblichen Mechanismen der E1A-vermittelten Interferenz des TGF- β -Signalwegs sind jedoch Retinoblastom-Protein- [375,377,379], p300/CBP- [380] und SMAD-abhängig [381].

Die Expressionsdaten zeigten eine Inhibition von SMAD3 nach Transduktion mit Ad5-Delo3RGD sowie mit Ad5-wt in den Gliomzelllinien (Tab. 14). Die virale Hemmung konnte ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 14). Diese Beobachtung ist bedeutungsvoll, da SMAD-Proteine, aufgrund ihrer Wirkung als Transkriptionsfaktoren, eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Nach Rezeptorstimulation bindet phosphoryliertes SMAD3 SMAD4. Der heteromere Komplex transloziert vom Zytoplasma zum Zellkern, wo die Transkription von Zielgenen reguliert wird [382,383]. Eine Reprimierung von SMAD-Proteinen resultiert voraussichtlich in einem biologisch relevanten Effekt, wobei eine Hemmung des Signalweges denkbar wäre. Wie groß die Auswirkungen der SMAD3-Hemmung auf den TGF- β -Signalweg sind, musste jedoch durch weitere Versuche abgeklärt werden.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Sekretionsassays ermittelt, ob die Inhibition von SMAD3 einen biologischen Effekt auf die Sekretion von Signalmolekülen des TGF- β -Signalwegs hat.

Der transformierenden Wachstumsfaktors (engl. *Transforming Growth Factor*) kann in drei Isoformen vorliegen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 [316,384,385]. Untersuchungen zeigen jedoch, dass TGF- β 1 und v.a. TGF- β 2 eine erhöhte Expression im Glioblastom aufweisen [386,387], desweiteren wurden im Plasma von Patienten erhöhte Level dieser Zytokine beobachtet [388]. Aus diesem Grunde wurde sich, in den für diese Arbeit durchgeführten Sekretionsassays, für die Detektion der Isoformen 1 und 2 entschieden. Im Sekretionsassay zeigte sich 72 h nach Transduktion, dass das Wildtypvirus in allen **TGF- β 2** sezernierenden Gliomzelllinien und das onkolytische Virus in 2/3 der Zelllinien zu einer **hoch-signifikanten Hemmung der Sekretion um bis zu 50 - 60 %** führt (Abb. 16 (C)). Ursächlich für die Regulation ist höchstwahrscheinlich die Inhibition SMAD3, sowie dem Sekretion beteiligtem Protein LTBP1 [389,390,391] und TGF- β 2 (Tab. 18). Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch kein relevanter Einfluss auf die TGF- β 1-Sekretion.

Um darzulegen, dass die verringerte Sekretion des Signalmoleküls TGF- β 2 Auswirkungen auf die Aktivität des gesamten Signalwegs hat, wurden Reporterassays durchgeführt. Für eine Messung der Transkriptionsaktivität mussten die Kulturen mit TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 stimuliert werden. Wie zu erwarten war, zeigte die *E1A*-Deletante Ad5-Ad312, aufgrund einer unveränderten Sekretion der Zytokine, keine Modulation der Aktivität in der TGF- β -Signaltransduktion, unabhängig vom Stimulanz. Wurden die Glioblastomzellen mit TGF- β 1 stimuliert, zeigten Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD ebenfalls keinen regulativen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität des Signalwegs. Alle beobachteten Tendenzen sind nicht signifikant. Die geringfügig erhöhte TGF- β 1-Sekretion nach Infektion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD hatte demnach keinen biologischen Effekt auf die Aktivität der Signaltransduktion (Abb. 16).

Ein gegenteiliges Bild ergab sich nach der Stimulation mit TGF- β 2. Das Wildtypvirus und das onkolytische Virus Ad5-Delo3RGD übten einen biologischen Effekt auf die Glioblastomzelllinien aus, der in einer hoch signifikanten und drastischen **Inhibition der SMAD2/SMAD3/SMAD4-spezifischen Transkriptionsaktivität um 40 – 65 %** resultierte. Diese Wirkung des Wildtypvirus und des onkolytische Virus ist jedoch nicht ausschließlich als Folge der Hemmung der TGF- β 2-Sekretion (Abb. 16) anzusehen. U-87MG zeigte ebenfalls eine Reduktion der TGF- β -Transkriptionsaktivität, obwohl die Zelllinie nachweislich kein TGF- β 2 sezernierte (Abb. 16 (A)). Dennoch, nach Stimulation mit TGF- β 2 konnte auch in U-87MG eine adenoviral vermittelte Inhibition der TGF- β spezifischen Transkription um 65 % festgestellt werden, höchstwahrscheinlich als Resultat der Hemmung von SMAD3 und vermutlich weiterer TGF- β assoziierter Faktoren, wie z.B. dem TGF- β 2-Rezeptor (Tab. 18).

Dem ungeachtet dient die Transkriptionsaktivität als Indikator für den Zustand des TGF- β -Signalwegs, somit lässt sich schlussfolgern, das Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD bereits bei niedrigen Virusdosen, also Viruspartikelzahl pro Zielzelle, eine starke Hemmung der TGF- β -Signaltransduktion bewirken. Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse und der Untersuchungen auf Proteinebene konnten funktionell bestätigt werden.

5.4.1.2 Selektive Hemmung von TGF- β 2 im Gliom

Die selektive Hemmung des Zytokins TGF- β 2 und dessen Signaltransduktion durch adenovirale Vektoren mit wildtyp bzw. mutierter *E1A*-Region haben eindeutig einen Einfluss auf die therapeutische Wirkung im Glioblastom. TGF- β 2 scheint hauptsächlich für die hohe TGF- β -Aktivität in Gliomen verantwortlich zu sein [392]. Diese These wird gestützt durch Untersuchungen mittels *antisense*-Technologie, bei der die Hemmung von TGF- β 2 zu einer reduzierten Proliferation bzw. Tumorzellwachstum führte, im Gegensatz zu TGF- β 1 [14,393]. Neben der Proliferation von Tumorzellen ist das Zytokin auch in weitere Prozesse involviert, u.a. Migration [394,395], Inaktivierung von regulatorischen T-Zellen durch T-Zellen und Monozyten [387,396,397,398,399], sowie Schädigung der Blut-Hirnschranke [400]. Eine Hemmung könnte nicht nur die Proliferation der Tumorzellen inhibieren, sondern aufgrund der starken immunsuppressiven Effekte von Gliomen, das Immunsystem für den Tumor resensibilisieren [401]. Aus diesen Gründen gibt es derzeit mehrere Therapieansätze, die eine Inhibition des TGF- β -Signalwegs zum Ziel haben. Dazu gehören die *antisense* Technologie [393], RNA-Interferenz [371], Gentransfer von TGF- β -Antagonisten [402] und pharmakologische Hemmer [403,404].

Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die **Hemmung von TGF- β 2 ein entscheidendes Kriterium für den Behandlungserfolg bei einer Virotherapie, mit wildtyp bzw. mutierter *E1A*-Region**, darstellt. TGF- β 2 ist demnach ein zellulärer Faktor, dem eine hohe Bedeutung in der Ad5-Delo3RGD-Therapie zugemessen werden muss. Bei einer Überexpression des Zytokins sprechen die Tumorzellen auf die Virotherapie höchstwahrscheinlich sehr gut an.

Die bisherigen Erfolge der *antisense*-Strategie gegen TGF- β 2 [405,406,407,408] stimmen optimistisch, dass eine Therapie mit onkolytischen Viren, bei der es ebenfalls zu einer Inhibition von TGF- β 2 kommt, vermutlich noch wirkungsvoller ist. Der Vorteil der adenoviralen Vektoren ist, dass eine Multi-Target-Therapie zur Anwendung kommt, da auf verschiedene neoplastische Faktoren, wie beispielsweise YB-1, MIR-181, VEGF und TGF- β , gleichzeitig Einfluss genommen werden würde.

Ferner wäre es sinnvoll, den therapeutischen Einsatz von Ad5-Delo3RGD bei weiteren TGF- β -überexprimierenden Tumoren, wie z.B. Pankreaskarzinomen [409,410] oder Melanomen [411,412] in Betracht zu ziehen und näher zu untersuchen.

5.4.1.3 Der TGF- β Signalweg und Wechselwirkungen mit VEGF

Neben VEGF können auch andere Faktoren auf unterschiedliche Weise die Angiogenese beeinflussen, dazu gehören die *Transforming Growth Factors* [413,414]. *In vitro* führte die Hemmung des TGF- β -Signalwegs im Gliommodell zu verbesserter Immunogenität, Inhibition des invasiven Wachstums und der Neoangiogenese [414,415,416]. Für TGF- β 1 konnte in verschiedenen Zellmodellen gezeigt werden, dass das Zytokin die VEGF-Expression stimuliert, z.T. genauso effektiv wie die Induktion der Genexpression durch Hypoxie [417,418,419,420,421,422].

Über den Einfluss von TGF- β 2 auf die Expression von VEGF gibt es gegensätzliche Berichte. So scheint das Zytokin in einer Vielzahl an Zellsystemen eine aktivierende [422,423,424,425], in anderen eine hemmende Wirkung [426,427] auf VEGF zu haben. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, zeigen eine reduzierte VEGF-Expression und Sekretion bei gleichzeitig verminderter TGF- β 2-Sekretion und Signaltransduktion. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass **TGF- β 2 im Gliommodell eine stimulierende Wirkung auf die Expression des Angiogenesefaktors VEGF** zu haben scheint. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass E1A die Expression von VEGF direkt hemmen kann (siehe Kapitel 5.3). Somit könnte E1A das Zytokin TGF- β 2 und den Angiogenesefaktor VEGF unabhängig voneinander inhibieren. Dennoch, bislang ist nur eine der zwei Wirkungsweisen zur Inhibition von VEGF durch E1A entschlüsselt. Unter hypoxischen Bedingungen hemmt E1A die HIF-1 α -vermittelten Transkription von VEGF [358,359]. Der Mechanismus der Hypoxie-unabhängigen Inhibition konnte bislang nicht vollständig aufgeklärt werden [358,360]. Nach den oben erwähnten Berichten über den Zusammenhang zwischen VEGF und TGF- β 2, sowie den in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen, könnte es sich bei dem **zweiten Mechanismus, der Hypoxie-unabhängigen Inhibition, um eine indirekte Hemmung von VEGF durch E1A handeln**. E1A würde somit TGF- β 2 hemmen, welches wiederum VEGF hemmt.

5.4.1.4 Potentieller Mechanismus der Hemmung des TGF- β -Signalwegs

Eine Zusammenfassung der potenziellen Mechanismen zur Hemmung von TGF- β 2 durch adenoviralen Vektoren mit (mutierter) E1A-Region ist in Abb. 18 dargestellt. Anhand von bereits bekannten Zusammenhängen und innerhalb dieser Arbeit dokumentierter Beobachtungen wurde eine Illustration erstellt, die die Hemmung des TGF- β -Signalwegs speziell in Gliomzellen veranschaulichen soll. Durch die Expression des viralen E1A-Proteins wird an verschiedenen Stellen der Signalweg von TGF- β gehemmt.

Die E1A-vermittelte Inhibition betrifft Rezeptoren, Koaktivatoren, den Tumorsuppressor Retinoblastomprotein und den Transkriptionsfaktor SMAD3. Die daraus resultierende Hemmung der TGF- β 2-Sekretion, sowie der TGF- β 2 vermittelten Expression von Targetgenen äußert sich u.a. in einer Hemmung des Angiogenesefaktors VEGF. Ebenso werden vermutlich weitere TGF- β vermittelte Funktionen wie Immunsuppression, Migration und Invasion inhibiert. Wobei eine detaillierte Aufklärung der biologischen Folgen der Hemmung von TGF- β 2 durch Ad5-Delo3RGD im Gliom weitere grundlegende Untersuchungen erforderlich machen.

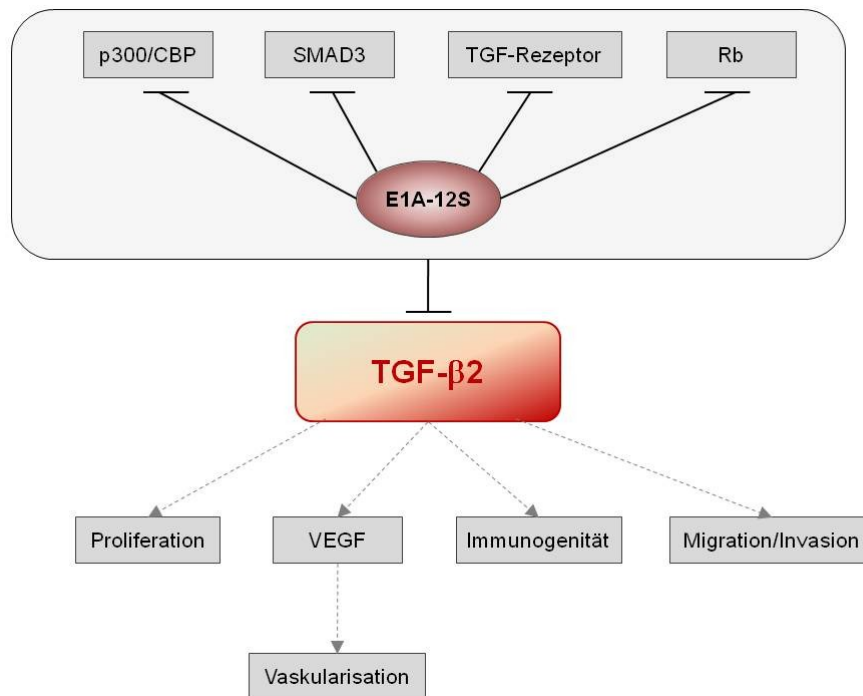


Abb. 18: Potentieller Mechanismus der Hemmung des TGF- β -Signalwegs und der Hypoxie-unabhängigen Inhibition von VEGF durch E1A in Glioblastomzellen

E1A-12S hemmt den TGF- β -Signalweg in Gliomzellen durch eine verringerte Transkription des TGF- β -Rezeptors Typ II [376,377] sowie durch Bindung der Koaktivatoren p300/CBP [428,429,430,431,432], des Transkriptionsfaktors SMAD3 [381] und des Tumorsuppressors Rb [261,375,377,379]. Die biologischen Effekte von E1A resultieren in einer Hemmung der TGF- β 2-Sekretion, sowie in einer verminderten TGF- β 2 vermittelten Expression von Targetgenen. Vermutlich wird als Folge die VEGF-Expression auf Gen- und Proteinebene inhibiert, was zu einer verminderten Vaskularisierung führt. Zudem lässt sich annehmen, dass weitere TGF- β -abhängige Eigenschaften der Gliomzellen, wie die Proliferation [369], die Migration [394,395] und Invasion [394,412], sowie die Maskierung der antitumoralen Abwehr [401,414,416], gehemmt werden.

5.5 Modell von Ad5-Delo3RGD-Therapie relevanten zellulären Faktoren im Gliom

Das Wissen um die Mechanismen der antineoplastischen Wirkung und von welchen Faktoren diese abhängen, ist in der Entwicklung und Anwendung von Tumorthérapien, wie der Ad5-Delo3RGD-Virotherapie, wesentlich. In verschiedenen Zellsystemen zeigte das onkolytische Virus unterschiedlich stark ausgeprägte antitumorale Aktivität [202,216].

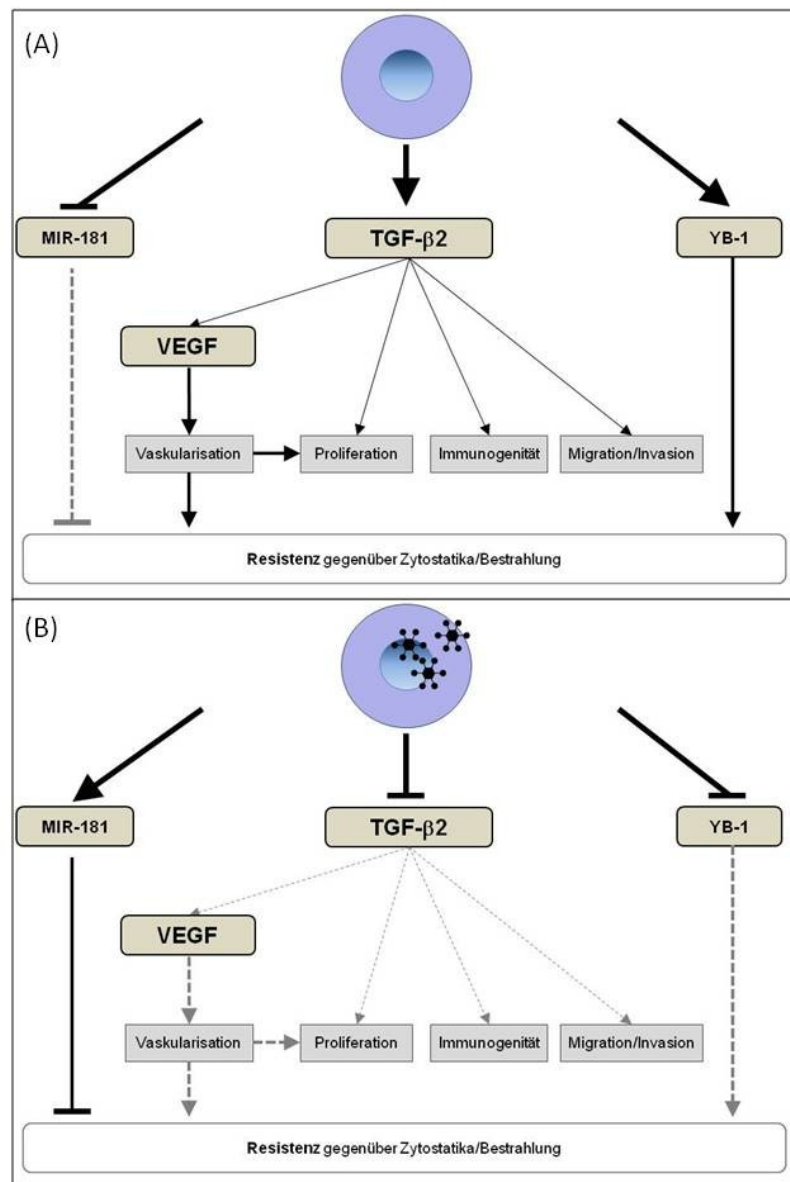


Abb. 19: Modell zur Darstellung von Ad5-Delo3RGD-Therapie relevanten zellulären Faktoren im Gliom.

(A). Die Überexpression von YB-1 [257] bzw. die verminderte Expression von MIR-181 spielt eine Rolle in der Ausbildung von Resistenzen im Gliom [9]. Zudem scheint auch eine verstärkte TGF-β2-Signalkaskade, vermittelt über die Regulation von VEGF, indirekt für einen geringeren Therapieerfolg bei der Behandlung mit Zytostatika verantwortlich zu sein.

(B) Nach viraler Transduktion kann im Zellkern das Y-Box Protein 1, aufgrund seiner *E1A-like activity* [271] die Replikation von *E1A*-mutierten Adenoviren einleiten. Infolgedessen ist YB-1 nicht mehr in der Lage seine Funktion bei der DNA-Reparatur wahrzunehmen. Weiterhin werden, bedingt durch die Virusreplikation, verschiedene tumorassoziierte Faktoren, wie TGF-β2 und VEGF gehemmt, sowie MIR-181 induziert. Neben einer Hemmung der Proliferation und einer Reaktivierung des Immunsystems gegenüber dem Tumor, begünstigen die viralen Regulationen eine Re-Sensitivierung der Tumorzelle für Zytostatika und Bestrahlung. Infolge der verabreichten Zytostatika oder Bestrahlung führen diese Modulationen zum Zelltod.

Auf Basis der durchgeführten Untersuchungen, konnte ein erstes Wirkungsmodell für maligne Gliome erstellt werden (Abb. 19), dass die Zusammenhänge zwischen zellulären Faktoren, viraler Ad5-Delo3RGD-Replikation, einem möglichen Behandlungserfolg, sowie der Resensitivierung gegenüber Bestrahlung bzw. Chemotherapie darlegt. Dem Konzept wird jedoch keine Vollständigkeit unterstellt, es soll lediglich als Arbeitsgrundlage zur Identifizierung von für die Virotherapie geeigneter Tumore bzw. zur Verbesserung der Therapie dienen. Das Modell lehnt sich an das *Mutually Synergistic Therapy-Modell* an [265].

5.5.1 Adenovirale Regulationen der Therapie-relevanten Faktoren vermittelt durch Ad5-Delo3RGD in Gliomzellen

Zelluläre Translokation von YB-1 durch virale Infektion

Ad5-Delo3RGD exprimiert E1A-12S, das die Expression von E1B-55K und E4orf6 induziert [325,326]. Die viralen Faktoren sind an der nukleären Translokation von YB-1 beteiligt [178,214,265], die ebenso durch den Einsatz von Zytostatika bzw. Bestrahlung induziert werden kann [213,221,222]. YB-1 kann anschließend die Replikation von *E1A*-mutierten Adenoviren einleiten [271], indem es an die drei Y-Boxen des *E2ALate* Promotors bindet und damit die Transkription der *E2*-Region aktiviert [178,214,267].

Virale Regulation von zellulären Faktoren (TGF- β 2, VEGF, MIR-181)

Das Adenovirus nimmt während des Replikationszyklus regulativen Einfluss auf zelluläre Faktoren, um für seine Replikation optimale Bedingungen zu schaffen. U.a. wird die Expression von TGF- β 2 und VEGF inhibiert bzw. von der microRNA MIR-181 induziert. Eine Hemmung von TGF- β 2 könnte neben der Aktivierung des Immunsystems gegenüber dem Tumor [401] und einer verminderten Proliferation von Tumorzellen [14,393], zudem über VEGF [413,414,422,423,424,425] Einfluss auf die Vaskularisierung nehmen.

Resensitivierung der infizierten Tumorzellen gegenüber Zytostatika/Bestrahlung

Die durch Ad5-Delo3RGD induzierten Regulationen von TGF- β 2, VEGF, sowie MIR-181 haben zusammengekommen eine Re-Sensitivierung der Gliomzellen gegenüber Zytostatika und Bestrahlung zur Folge. So ist eine verstärkte Expression von MIR-181 mit einer Sensitivierung gegenüber Bestrahlung [9] und Chemotherapeutika [7] verbunden. Darüberhinaus konnte in einem Behandlungsansatz zur VEGF-Inhibition gezeigt werden, dass der resultierende verringerte interstitielle Druck zu einer besseren Erreichbarkeit der Chemotherapie bei Tumorzellen führte [363,364,366]. Zudem konnten Gao *et al.* 2009 zeigen, dass YB-1 an einer Temozolomidresistenz im Glioblastom beteiligt ist, die unabhängig vom bekannten MGMT-Mechanismus ist [257]. Vermutlich würde, aufgrund einer Zweck-

entfremdung von YB-1 durch die virale Replikation, ein „natürlicher Knockdown“ ebenfalls in einer Re-Sensitivierung der Gliomzellen gegenüber TMZ resultieren.

Die Re-Sensitivierung der Tumorzellen ist von immenser Relevanz, da generell gilt, dass maligne Gliome mäßig strahlensensibel [62] und fast immer chemoresistent [433,434] sind. Selbst das alkylierenden Agens Temozolomid, welches zumindest einen gewissen Effekt auf das Tumorwachstum ausüben kann, verlängert das mediane Überleben der Patienten mit kombinierter Strahlentherapie durchschnittlich lediglich um zwei Monate [65,435].

Insofern kann das hier vorgestellte Modell, um die Faktoren TGF- β 2, VEGF und MIR-181 in der Entwicklung neuer Strategien und Therapien hilfreich sein und ergänzt das bereits bestehende YB-1-basierende *MUST*-Modell. Die Aktivität der zellulären Faktoren YB-1, TGF- β 2, VEGF, sowie MIR-181 erlauben eine aussagekräftige Beurteilung über einen möglichen Behandlungserfolg von Ad5-Delo3RGD, bzw. *E1A*-mutierten Viren, in zu therapierbaren Tumoren. Ferner erlaubt es die Verbesserung der Virotherapie durch eine Auswahl an sinnvollen Kandidaten für die Insertion therapeutischer Transgene.

6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten einer Charakterisierung der Modulation der zellulären Genexpression nach Transduktion von Gliomzellen mit adenoviralen Vektoren, mit verschiedenen *E1A*-Genstatus. Es konnten drei zellulären Faktoren, VEGF, TGF- β 2 und MIR-181, identifiziert werden, deren Regulation charakteristisch für die antitumorale Wirkung einer Therapie mit *E1A*-mutierten onkolytischen Adenoviren ist. Die Kenntnis über den Einfluss dieser Faktoren, ist für die klinische Anwendung und Kombinationstherapien von erheblicher Relevanz. In klinischen Studien gab es bereits erste ermutigende Erfolge in der Gliomtherapie nach Hemmung von TGF- β 2 [406,436] bzw. VEGF [437,438]. Dementsprechend geben die hier präsentierten Ergebnisse Anlass zu der Vermutung, dass die Therapie mit Ad5-Delo3RGD, die gleichzeitig mehrere Faktoren anspricht, eine größere therapeutische Wirkung v.a. in Kombination mit Chemotherapie bzw. Bestrahlung entfalten könnte.

Die Kenntnis über den Einfluss von VEGF, TGF- β und MIR-181 auf die Virotherapie im Gliom, ermöglicht zudem eine Verbesserung der adenoviralen Vektoren durch Einsatz von therapeutischen Transgenen in der deletierten *E3*-Region, die die antineoplastische Wirkung weiter verstärken. Mögliche Kandidaten für die Gliomtherapie wären beispielsweise die microRNA MIR-181 bzw. anti-TGF- β 2 oder anti-VEGF siRNA.

In der Ad5-Delo3RGD-basierten Behandlung von Glioblastomen ist der Eintritt in die klinische Phase in den kommenden Jahren absehbar. Zukünftig wird es ferner Untersuchungen über den Einsatz von Ad5-Delo3RGD in weiteren YB-1 positiven Tumoren geben, die aufgrund ihrer erhöhten Aktivität des TGF- β -Signalwegs geeignet für eine entsprechende Virotherapie wären, dazu zählen z.B. Mammakarzinome [230,231,232,439,440,441,442], Kolonkarzinome [229,443,444], Melanome [411,412,445,446,447] oder Ovarialkarzinome [233,234,448,449,450]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass der Einfluss von *E1A* auf den TGF- β -Signalweg, sowie die Wechselwirkungen von TGF- β und VEGF offenbar vom Zellsystem abhängig ist und deshalb vorab untersucht werden müsste.

Über den viralen Einfluss auf zelluläre microRNAs gibt es bislang nur vereinzelt Studien. Aufgrund der gewonnenen Daten über den Bedeutung von MIR-181 im malignem Gliom bzw. in der Virotherapie ist es sinnvoll, diese Thematik genauer zu untersuchen. Eine Analyse der Modulation der miRNA-Expressionsmuster nach viraler Transduktion mittels microRNA *Microarrays*, sollte den Ausgangspunkt einer solchen Fragestellung bilden.

Zunächst muss sich jedoch der klinische Anwendung des viralen Vektors als sicher erweisen. Die meisten *in vivo*-Modellsysteme sind murin und somit semi- oder nicht-permissiv für Adenoviren. Dementsprechend stellen *in vivo*-Daten aus murinen Modellen, lediglich idealisierte Beobachtungen der antitumoralen Aktivität dar. Ob sich die YB-1-assoziierte virale Replikation wirklich nur auf Tumorgewebe beschränkt und in wieweit die umgebenden gesunden Zellen ebenfalls eine Replikation zu lassen bzw. wie der Verlauf Immunreaktion ist [451,452], muss noch eingehender untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Ciafre, S. A.; Galardi, S.; Mangiola, A.; Ferracin, M.; Liu, C. G.; Sabatino, G., et al. (2005): Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 334), Nr. 4, Seite 1351-8
- [2] Godlewski, J.; Nowicki, M. O.; Bronisz, A.; Williams, S.; Otsuki, A.; Nuovo, G., et al. (2008): Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal, *Cancer Res* (Band 68), Nr. 22, Seite 9125-30
- [3] Zhang, Y.; Chao, T.; Li, R.; Liu, W.; Chen, Y.; Yan, X., et al. (2009): MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a, *J Mol Med* (Band 87), Nr. 1, Seite 43-51
- [4] Silber, J.; Lim, D. A.; Petritsch, C.; Persson, A. I.; Maunakea, A. K.; Yu, M., et al. (2008): miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells, *BMC Med* (Band 6), Seite 14
- [5] Shi, L.; Cheng, Z.; Zhang, J.; Li, R.; Zhao, P.; Fu, Z., et al. (2008): hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells, *Brain Res* (Band 1236), Seite 185-93
- [6] Conti, A.; Aguenouz, M.; La Torre, D.; Tomasello, C.; Cardali, S.; Angileri, F. F., et al. (2009): miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors, *J Neurooncol* (Band 93), Nr. 3, Seite 325-32
- [7] Galluzzi, L.; Morselli, E.; Vitale, I.; Kepp, O.; Senovilla, L.; Criollo, A., et al. (2010): miR-181a and miR-630 regulate cisplatin-induced cancer cell death, *Cancer Res* (Band 70), Nr. 5, Seite 1793-803
- [8] Zhu, W.; Shan, X.; Wang, T.; Shu, Y. und Liu, P. (2010): miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines, *Int J Cancer*
- [9] Chen, G.; Zhu, W.; Shi, D.; Lv, L.; Zhang, C.; Liu, P., et al. (2010): MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2, *Oncol Rep* (Band 23), Nr. 4, Seite 997-1003
- [10] Burger, P. C.; Vogel, F. S.; Green, S. B. und Strike, T. A. (1985): Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications, *Cancer* (Band 56), Nr. 5, Seite 1106-11
- [11] Daumas-Duport, C.; Scheithauer, B.; O'Fallon, J. und Kelly, P. (1988): Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method, *Cancer* (Band 62), Nr. 10, Seite 2152-65
- [12] Long, D. M. (1970): Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors, *J Neurosurg* (Band 32), Nr. 2, Seite 127-44
- [13] Leon, S. P.; Folkert, R. D. und Black, P. M. (1996): Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors, *Cancer* (Band 77), Nr. 2, Seite 362-72
- [14] Jachimczak, P.; Hessdorfer, B.; Fabel-Schulte, K.; Wismeth, C.; Brysch, W.; Schlingensiepen, K. H., et al. (1996): Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides, *Int J Cancer* (Band 65), Nr. 3, Seite 332-7
- [15] Reiss, M. (1999): TGF-beta and cancer, *Microbes Infect* (Band 1), Nr. 15, Seite 1327-47
- [16] Furnari, F. B.; Fenton, T.; Bachoo, R. M.; Mukasa, A.; Stommel, J. M.; Stegh, A., et al. (2007): Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes Dev* (Band 21), Nr. 21, Seite 2683-710
- [17] Kleihues, P.; Louis, D. N.; Scheithauer, B. W.; Rorke, L. B.; Reifenberger, G.; Burger, P. C., et al. (2002): The WHO classification of tumors of the nervous system, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 61), Nr. 3, Seite 215-25; discussion 226-9
- [18] Pytel, P. und Lukas, R. V. (2009): Update on diagnostic practice: tumors of the nervous system, *Arch Pathol Lab Med* (Band 133), Nr. 7, Seite 1062-77
- [19] Marras, L. C.; Geerts, W. H. und Perry, J. R. (2000): The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review, *Cancer* (Band 89), Nr. 3, Seite 640-6

- [20] Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD (1997): Zentrales Nervensystem / Tumoren des Nervensystems, Böcker W, Denk H, Heitz PU, Pathologie, Urban&Schwarzenberg München, Wien
- [21] Westphal M, Winking M (2003): Intrakranielle Druckerhöhung, Schlegel U, Weller M, Westphal M, Neuroonkologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- [22] Schirmer, M (1998), 9. Auflage, Neurochirurgie-Eine Einführung, Urban&Schwarzenberg München, Wien
- [23] Melean, G.; Sestini, R.; Ammannati, F. und Papi, L. (2004): Genetic insights into familial tumors of the nervous system, Am J Med Genet C Semin Med Genet (Band 129C), Nr. 1, Seite 74-84
- [24] Srivastava, S.; Zou, Z. Q.; Pirolo, K.; Blattner, W. und Chang, E. H. (1990): Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome, Nature (Band 348), Nr. 6303, Seite 747-9
- [25] Sadetzki, S.; Chetrit, A.; Freedman, L.; Stovall, M.; Modan, B. und Novikov, I. (2005): Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis, Radiat Res (Band 163), Nr. 4, Seite 424-32
- [26] Gu, J.; Liu, Y.; Kyritsis, A. P. und Bondy, M. L. (2009): Molecular epidemiology of primary brain tumors, Neurotherapeutics (Band 6), Nr. 3, Seite 427-35
- [27] McLendon, R. E.; Robinson, J. S., Jr.; Chambers, D. B.; Grufferman, S. und Burger, P. C. (1985): The glioblastoma multiforme in Georgia, 1977-1981, Cancer (Band 56), Nr. 4, Seite 894-7
- [28] Virchow, R. (1864-65): Die krankhaften Geschwülste (Band Band I-III), Hirschwald, Berlin
- [29] Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvett, A., et al. (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, Acta Neuropathol (Band 114), Nr. 2, Seite 97-109
- [30] Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS (2002-2006): Distribution and Incidence Rates of Primary (Malignant and Non-Malignant) Brain and CNS Tumors by Major Histology Groupings and Histology, Age-Adjusted to the 2000 U.S. Standard Population, <http://www.cbtrus.org/2009EighteenStates/Table12.pdf>, Stand: 01.10.2010
- [31] Vertosick, F. T., Jr.; Selker, R. G. und Arena, V. C. (1991): Survival of patients with well-differentiated astrocytomas diagnosed in the era of computed tomography, Neurosurgery (Band 28), Nr. 4, Seite 496-501
- [32] Kleihues, P. und Ohgaki, H. (2000): Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors, Toxicol Pathol (Band 28), Nr. 1, Seite 164-70
- [33] Scherer, HJ (1940): Cerebral astrocytomas and their derivatives, Am J Cancer (Band 40), Seite 159-198
- [34] von Deimling, A.; von Ammon, K.; Schoenfeld, D.; Wiestler, O. D.; Seizinger, B. R. und Louis, D. N. (1993): Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis, Brain Pathol (Band 3), Nr. 1, Seite 19-26
- [35] Lang, F. F.; Miller, D. C.; Koslow, M. und Newcomb, E. W. (1994): Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors, J Neurosurg (Band 81), Nr. 3, Seite 427-36
- [36] Watanabe, K.; Tachibana, O.; Sata, K.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P. und Ohgaki, H. (1996): Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas, Brain Pathol (Band 6), Nr. 3, Seite 217-23; discussion 23-4
- [37] Kleihues, P. und Ohgaki, H. (1999): Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis, Neuro Oncol (Band 1), Nr. 1, Seite 44-51
- [38] Böker DK, Mennel HD (2002): Maligne Tumoren des Zentralnervensystems, Böker DK, Mennel HD, Hermanek P, Spraul CW, Klassifikation maligner Tumoren des ZNS und der Augen, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- [39] Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P (2002): Tumours of the nervous system, 7. Auflage, Graham DI, Lantos PL Greenfield's Neuropathology, Arnold, London, New York, New Delhi

- [40] Davis, F. G.; McCarthy, B. J.; Freels, S.; Kupelian, V. und Bondy, M. L. (1999): The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data, *Cancer* (Band 85), Nr. 2, Seite 485-91
- [41] McCormack, B. M.; Miller, D. C.; Budzilovich, G. N.; Voorhees, G. J. und Ransohoff, J. (1992): Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults--1977-1988, *Neurosurgery* (Band 31), Nr. 4, Seite 636-42; discussion 642
- [42] DeAngelis, L. M. (2001): Brain tumors, *N Engl J Med* (Band 344), Nr. 2, Seite 114-23
- [43] Ohgaki, H. und Kleihues, P. (2007): Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *Am J Pathol* (Band 170), Nr. 5, Seite 1445-53
- [44] Smith, J. S. und Jenkins, R. B. (2000): Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications, *Front Biosci* (Band 5), Seite D213-31
- [45] Reni, M.; Cozzarini, C.; Ferreri, A. J.; Ceresoli, G. L.; Galli, L.; Bianchi, A., et al. (2000): A retrospective analysis of postradiation chemotherapy in 133 patients with glioblastoma multiforme, *Cancer Invest* (Band 18), Nr. 6, Seite 510-5
- [46] Brada, M.; Sharpe, G.; Rajan, B.; Britton, J.; Wilkins, P. R.; Guerrero, D., et al. (1999): Modifying radical radiotherapy in high grade gliomas; shortening the treatment time through acceleration, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 43), Nr. 2, Seite 287-92
- [47] Shibamoto, Y.; Yamashita, J.; Takahashi, M.; Yamasaki, T.; Kikuchi, H. und Abe, M. (1990): Supratentorial malignant glioma: an analysis of radiation therapy in 178 cases, *Radiother Oncol* (Band 18), Nr. 1, Seite 9-17
- [48] Winger, M. J.; Macdonald, D. R. und Cairncross, J. G. (1989): Supratentorial anaplastic gliomas in adults. The prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma, *J Neurosurg* (Band 71), Nr. 4, Seite 487-93
- [49] Ohgaki, H. und Kleihues, P. (2009): Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas, *Cancer Sci* (Band 100), Nr. 12, Seite 2235-41
- [50] Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1993): The multistep nature of cancer, *Trends Genet* (Band 9), Nr. 4, Seite 138-41
- [51] Jackson, R. J.; Fuller, G. N.; Abi-Said, D.; Lang, F. F.; Gokaslan, Z. L.; Shi, W. M., et al. (2001): Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas, *Neuro Oncol* (Band 3), Nr. 3, Seite 193-200
- [52] Scott, C. B.; Scarantino, C.; Urtasun, R.; Movsas, B.; Jones, C. U.; Simpson, J. R., et al. (1998): Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (Band 40), Nr. 1, Seite 51-5
- [53] Lacroix, M.; Abi-Said, D.; Fourney, D. R.; Gokaslan, Z. L.; Shi, W.; DeMonte, F., et al. (2001): A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *J Neurosurg* (Band 95), Nr. 2, Seite 190-8
- [54] Hofer, S.; Roelcke, U. und Herrmann, R. (1999): [New aspects of interdisciplinary therapy for malignant gliomas in adults], *Schweiz Med Wochenschr* (Band 129), Nr. 37, Seite 1332-41
- [55] Weller, Prof. Dr. M. (2008): Gliome, (NOA), Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft. Leitlinien der DGN
<http://www.neuroonkologie.de/fileadmin/neuroonkologie/pdf/leitlinien2008/Gliome.pdf>, Stand: 25.10.2011
- [56] Burger, P. C.; Heinz, E. R.; Shibata, T. und Kleihues, P. (1988): Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme, *J Neurosurg* (Band 68), Nr. 5, Seite 698-704
- [57] Reifenberger, G. und Collins, V. P. (2004): Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas, *J Mol Med* (Band 82), Nr. 10, Seite 656-70
- [58] Kleihues P, Cavenee WK (2000): Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System, WHO Classifications, IARC Press, Lyon
- [59] Weller, M (2003): Primäre Hirntumoren und ZNS-Metastasen. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Interdisziplinäres Tumorzentrum, Klinikum, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen", Schriftenreihe „Therapieempfehlungen ITZ, 4

- [60] Nelson, D. F.; Diener-West, M.; Horton, J.; Chang, C. H.; Schoenfeld, D. und Nelson, J. S. (1988): Combined modality approach to treatment of malignant gliomas--re-evaluation of RTOG 7401/ECOG 1374 with long-term follow-up: a joint study of the Radiation Therapy Oncology Group and the Eastern Cooperative Oncology Group, NCI Monogr, Nr. 6, Seite 279-84
- [61] Walker, M. D.; Alexander, E., Jr.; Hunt, W. E.; MacCarty, C. S.; Mahaley, M. S., Jr.; Mealey, J., Jr., et al. (1978): Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial, J Neurosurg (Band 49), Nr. 3, Seite 333-43
- [62] Kleinberg, L.; Grossman, S. A.; Piantadosi, S.; Zeltzman, M. und Wharam, M. (1999): The effects of sequential versus concurrent chemotherapy and radiotherapy on survival and toxicity in patients with newly diagnosed high-grade astrocytoma, Int J Radiat Oncol Biol Phys (Band 44), Nr. 3, Seite 535-43
- [63] Ostermann, S.; Csajka, C.; Buclin, T.; Leyvraz, S.; Lejeune, F.; Decosterd, L. A., et al. (2004): Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients, Clin Cancer Res (Band 10), Nr. 11, Seite 3728-36
- [64] Hegi, M. E.; Diserens, A. C.; Gorlia, T.; Hamou, M. F.; de Tribolet, N.; Weller, M., et al. (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, N Engl J Med (Band 352), Nr. 10, Seite 997-1003
- [65] Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J., et al. (2005): Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, N Engl J Med (Band 352), Nr. 10, Seite 987-96
- [66] Reardon, D. A.; Rich, J. N.; Friedman, H. S. und Bigner, D. D. (2006): Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma, J Clin Oncol (Band 24), Nr. 8, Seite 1253-65
- [67] Anderson, W. F. (1998): Human gene therapy, Nature (Band 392), Nr. 6679 Suppl, Seite 25-30
- [68] John Wiley & Sons, Inc. (2009): Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, John Wiley & Sons, Inc., Journal of Gene Medicine, <http://eu.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>, Stand: 01.10. 2010
- [69] Cavazzana-Calvo, M.; Thrasher, A. und Mavilio, F. (2004): The future of gene therapy, Nature (Band 427), Nr. 6977, Seite 779-81
- [70] Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P., et al. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, Science (Band 288), Nr. 5466, Seite 669-72
- [71] Patil, S. D.; Rhodes, D. G. und Burgess, D. J. (2005): DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review, AAPS J (Band 7), Nr. 1, Seite E61-77
- [72] Hallek, M.; Buening, H.; Ried, M.; Hacker, U.; Kurzeder, C. und Wendtner, C. M. (2001): [Basis of gene therapy: principles and state of development], Internist (Berl) (Band 42), Nr. 10, Seite 1306-8, 1311-3
- [73] Lundstrom, K. (2003): Latest development in viral vectors for gene therapy, Trends Biotechnol (Band 21), Nr. 3, Seite 117-22
- [74] Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P., et al. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, Science (Band 302), Nr. 5644, Seite 415-9
- [75] Marshall, E. (2003): Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia, Science (Band 299), Nr. 5605, Seite 320
- [76] Verma, I. M. und Somia, N. (1997): Gene therapy -- promises, problems and prospects, Nature (Band 389), Nr. 6648, Seite 239-42
- [77] Naldini, L.; Blomer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H., et al. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, Science (Band 272), Nr. 5259, Seite 263-7
- [78] Horwitz, M. S. (1996), Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York
- [79] Shenk, TE (2001): Adenoviridae: the viruses and their replication, 4. Auflage, Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

- [80] Parker, J. N.; Bauer, D. F.; Cody, J. J. und Markert, J. M. (2009): Oncolytic viral therapy of malignant glioma, *Neurotherapeutics* (Band 6), Nr. 3, Seite 558-69
- [81] Sonabend, A. M.; Ulasov, I. V. und Lesniak, M. S. (2006): Conditionally replicative adenoviral vectors for malignant glioma, *Rev Med Virol* (Band 16), Nr. 2, Seite 99-115
- [82] Rowe, W. P.; Huebner, R. J.; Gilmore, L. K.; Parrott, R. H. und Ward, T. G. (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture, *Proc Soc Exp Biol Med* (Band 84), Nr. 3, Seite 570-3
- [83] Berget, S. M. und Sharp, P. A. (1977): A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA, *Brookhaven Symp Biol*, Nr. 29, Seite 332-44
- [84] Chow, L. T.; Gelinas, R. E.; Broker, T. R. und Roberts, R. J. (1977): An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA, *Cell* (Band 12), Nr. 1, Seite 1-8
- [85] Eiz, B. und Pring-Akerblom, P. (1997): Molecular characterization of the type-specific gamma-determinant located on the adenovirus fiber, *J Virol* (Band 71), Nr. 9, Seite 6576-81
- [86] Hierholzer, J. C. (1973): Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination, *J Infect Dis* (Band 128), Nr. 4, Seite 541-50
- [87] Mei, Y. F. und Wadell, G. (1996): Epitopes and hemagglutination binding domain on subgenus B:2 adenovirus fibers, *J Virol* (Band 70), Nr. 6, Seite 3688-97
- [88] Wadell, G.; Allard, A.; Johansson, M.; Svensson, L. und Uhnö, I. (1987): Enteric adenoviruses, *Ciba Found Symp* (Band 128), Seite 63-91
- [89] Graham, F. L.; Rowe, D. T.; McKinnon, R.; Bacchetti, S.; Ruben, M. und Branton, P. E. (1984): Transformation by human adenoviruses, *J Cell Physiol Suppl* (Band 3), Seite 151-63
- [90] Doerfler, W. (1983): The molecular biology of Adenoviruses, *Current topics in microbiology and immunology*, Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
- [91] Rux, J. J. und Burnett, R. M. (2004): Adenovirus structure, *Hum Gene Ther* (Band 15), Nr. 12, Seite 1167-76
- [92] San Martin, C. und Burnett, R. M. (2003): Structural studies on adenoviruses, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 272), Seite 57-94
- [93] Davison, A. J.; Benko, M. und Harrach, B. (2003): Genetic content and evolution of adenoviruses, *J Gen Virol* (Band 84), Nr. Pt 11, Seite 2895-908
- [94] Zhang, W. W. (1999): Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer, *Cancer Gene Ther* (Band 6), Nr. 2, Seite 113-38
- [95] Bergelson, J. M.; Krithivas, A.; Celi, L.; Droguett, G.; Horwitz, M. S.; Wickham, T., et al. (1998): The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses, *J Virol* (Band 72), Nr. 1, Seite 415-9
- [96] Santis, G.; Legrand, V.; Hong, S. S.; Davison, E.; Kirby, I.; Imler, J. L., et al. (1999): Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR, *J Gen Virol* (Band 80 (Pt 6)), Seite 1519-27
- [97] Wickham, T. J.; Mathias, P.; Cheresch, D. A. und Nemerow, G. R. (1993): Integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment, *Cell* (Band 73), Nr. 2, Seite 309-19
- [98] Nemerow, G. R. und Stewart, P. L. (1999): Role of $\alpha(v)$ integrins in adenovirus cell entry and gene delivery, *Microbiol Mol Biol Rev* (Band 63), Nr. 3, Seite 725-34
- [99] Mathias, P.; Wickham, T.; Moore, M. und Nemerow, G. (1994): Multiple adenovirus serotypes use αv integrins for infection, *J Virol* (Band 68), Nr. 10, Seite 6811-4
- [100] Meier, O. und Greber, U. F. (2004): Adenovirus endocytosis, *J Gene Med* (Band 6 Suppl 1), Seite S152-63
- [101] Cotten, M. und Weber, J. M. (1995): The adenovirus protease is required for virus entry into host cells, *Virology* (Band 213), Nr. 2, Seite 494-502
- [102] Wang, K.; Huang, S.; Kapoor-Munshi, A. und Nemerow, G. (1998): Adenovirus internalization and infection require dynamin, *J Virol* (Band 72), Nr. 4, Seite 3455-8
- [103] Saphire, A. C.; Guan, T.; Schirmer, E. C.; Nemerow, G. R. und Gerace, L. (2000): Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 6, Seite 4298-304

- [104] Angeletti, P. C. und Engler, J. A. (1998): Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix, *J Virol* (Band 72), Nr. 4, Seite 2896-904
- [105] Shenk, T. (1996): *Adenoviridae: The viruses and their replication*, 3rd. Auflage, Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Fields Virology, Lippincott-Raven, Philadelphia
- [106] Tibbetts, C.; Larsen, P. L. und Jones, S. N. (1986): Autoregulation of adenovirus E1A gene expression, *J Virol* (Band 57), Nr. 3, Seite 1055-64
- [107] Lee, K. A.; Hai, T. Y.; SivaRaman, L.; Thimmappaya, B.; Hurst, H. C.; Jones, N. C., et al. (1987): A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 23, Seite 8355-9
- [108] Dyson, N.; Guida, P.; McCall, C. und Harlow, E. (1992): Adenovirus E1A makes two distinct contacts with the retinoblastoma protein, *J Virol* (Band 66), Nr. 7, Seite 4606-11
- [109] Johnson, D. G.; Schwarz, J. K.; Cress, W. D. und Nevins, J. R. (1993): Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase, *Nature* (Band 365), Nr. 6444, Seite 349-52
- [110] Wu, L.; Rosser, D. S.; Schmidt, M. C. und Berk, A. (1987): A TATA box implicated in E1A transcriptional activation of a simple adenovirus 2 promoter, *Nature* (Band 326), Nr. 6112, Seite 512-5
- [111] Maxfield, L. F. und Spector, D. J. (1997): Readthrough activation of early adenovirus E1b gene transcription, *J Virol* (Band 71), Nr. 11, Seite 8321-9
- [112] White, E. und Cipriani, R. (1990): Role of adenovirus E1B proteins in transformation: altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein, *Mol Cell Biol* (Band 10), Nr. 1, Seite 120-30
- [113] Pearson, A. S.; Spitz, F. R.; Swisher, S. G.; Kataoka, M.; Sarkiss, M. G.; Meyn, R. E., et al. (2000): Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells, *Clin Cancer Res* (Band 6), Nr. 3, Seite 887-90
- [114] Subramanian, T.; Boyd, J. M. und Chinnadurai, G. (1995): Functional substitution identifies a cell survival promoting domain common to adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins, *Oncogene* (Band 11), Nr. 11, Seite 2403-9
- [115] Han, J.; Sabbatini, P.; Perez, D.; Rao, L.; Modha, D. und White, E. (1996): The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 4, Seite 461-77
- [116] Sundararajan, R.; Cuconati, A.; Nelson, D. und White, E. (2001): Tumor necrosis factor- α induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 48, Seite 45120-7
- [117] van den Heuvel, S. J.; van Laar, T.; Kast, W. M.; Melief, C. J.; Zantema, A. und van der Eb, A. J. (1990): Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55kd proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells, *EMBO J* (Band 9), Nr. 8, Seite 2621-9
- [118] Yew, P. R. und Berk, A. J. (1992): Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein, *Nature* (Band 357), Nr. 6373, Seite 82-5
- [119] Goodrum, F. D. und Ornelles, D. A. (1999): Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication, *J Virol* (Band 73), Nr. 9, Seite 7474-88
- [120] Hay, R. T.; Freeman, A.; Leith, I.; Monaghan, A. und Webster, A. (1995): Molecular interactions during adenovirus DNA replication, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 199 (Pt 2)), Seite 31-48
- [121] de Jong, R. N.; Meijer, L. A. und van der Vliet, P. C. (2003): DNA binding properties of the adenovirus DNA replication priming protein pTP, *Nucleic Acids Res* (Band 31), Nr. 12, Seite 3274-86
- [122] Temperley, S. M. und Hay, R. T. (1992): Recognition of the adenovirus type 2 origin of DNA replication by the virally encoded DNA polymerase and preterminal proteins, *EMBO J* (Band 11), Nr. 2, Seite 761-8

- [123] Nagata, K.; Guggenheimer, R. A.; Enomoto, T.; Lichy, J. H. und Hurwitz, J. (1982): Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 79), Nr. 21, Seite 6438-42
- [124] Pruijn, G. J.; van Driel, W. und van der Vliet, P. C. (1986): Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication, *Nature* (Band 322), Nr. 6080, Seite 656-9
- [125] Nagata, K.; Guggenheimer, R. A. und Hurwitz, J. (1983): Adenovirus DNA replication in vitro: synthesis of full-length DNA with purified proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 80), Nr. 14, Seite 4266-70
- [126] Baker, C. C. und Ziff, E. B. (1981): Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2, *J Mol Biol* (Band 149), Nr. 2, Seite 189-221
- [127] Wold, W. S. und Gooding, L. R. (1991): Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions, *Virology* (Band 184), Nr. 1, Seite 1-8
- [128] Liu, T. C.; Wang, Y.; Hallden, G.; Brooks, G.; Francis, J.; Lemoine, N. R., et al. (2005): Functional interactions of antiapoptotic proteins and tumor necrosis factor in the context of a replication-competent adenovirus, *Gene Ther* (Band 12), Nr. 17, Seite 1333-46
- [129] Tollefson, A. E.; Scaria, A.; Hermiston, T. W.; Ryerse, J. S.; Wold, L. J. und Wold, W. S. (1996): The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells, *J Virol* (Band 70), Nr. 4, Seite 2296-306
- [130] Krajcsi, P.; Tollefson, A. E. und Wold, W. S. (1992): The E3-14.5K integral membrane protein of adenovirus that is required for down-regulation of the EGF receptor and for prevention of TNF cytotoxicity is O-glycosylated but not N-glycosylated, *Virology* (Band 188), Nr. 2, Seite 570-9
- [131] Gooding, L. R.; Elmore, L. W.; Tollefson, A. E.; Brady, H. A. und Wold, W. S. (1988): A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytotoxicity by tumor necrosis factor, *Cell* (Band 53), Nr. 3, Seite 341-6
- [132] Hermiston, T. W.; Tripp, R. A.; Sparer, T.; Gooding, L. R. und Wold, W. S. (1993): Deletion mutation analysis of the adenovirus type 2 E3-gp19K protein: identification of sequences within the endoplasmic reticulum lumenal domain that are required for class I antigen binding and protection from adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes, *J Virol* (Band 67), Nr. 9, Seite 5289-98
- [133] Lichtenstein, D. L.; Doronin, K.; Toth, K.; Kuppuswamy, M.; Wold, W. S. und Tollefson, A. E. (2004): Adenovirus E3-6.7K protein is required in conjunction with the E3-RID protein complex for the internalization and degradation of TRAIL receptor 2, *J Virol* (Band 78), Nr. 22, Seite 12297-307
- [134] Halbert, D. N.; Cutt, J. R. und Shenk, T. (1985): Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff, *J Virol* (Band 56), Nr. 1, Seite 250-7
- [135] Flint, S. J. und Gonzalez, R. A. (2003): Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 272), Seite 287-330
- [136] Weigel, S. und Dobbelstein, M. (2000): The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA, *J Virol* (Band 74), Nr. 2, Seite 764-72
- [137] Challberg, M. D. und Kelly, T. J., Jr. (1979): Adenovirus DNA replication in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 76), Nr. 2, Seite 655-9
- [138] Philipson, L. (1984): Structure and assembly of adenoviruses, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 109), Seite 1-52
- [139] Rao, L.; Perez, D. und White, E. (1996): Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis, *J Cell Biol* (Band 135), Nr. 6 Pt 1, Seite 1441-55
- [140] Tollefson, A. E.; Ryerse, J. S.; Scaria, A.; Hermiston, T. W. und Wold, W. S. (1996): The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants, *Virology* (Band 220), Nr. 1, Seite 152-62

- [141] Taqi, A. M.; Abdurrahman, M. B.; Yakubu, A. M. und Fleming, A. F. (1981): Regression of Hodgkin's disease after measles, *Lancet* (Band 1), Nr. 8229, Seite 1112
- [142] Bluming, A. Z. und Ziegler, J. L. (1971): Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection, *Lancet* (Band 2), Nr. 7715, Seite 105-6
- [143] De Pace, NG (1912): Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica, *Ginecologia* (France) (Band 9), Seite 82-88
- [144] Huebner, R. J.; Rowe, W. P.; Schatten, W. E.; Smith, R. R. und Thomas, L. B. (1956): Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix, *Cancer* (Band 9), Nr. 6, Seite 1211-8
- [145] Asada, T. (1974): Treatment of human cancer with mumps virus, *Cancer* (Band 34), Nr. 6, Seite 1907-28
- [146] Okuno, Y.; Asada, T.; Yamanishi, K.; Otsuka, T.; Takahashi, M.; Tanioka, T., et al. (1978): Studies on the use of mumps virus for treatment of human cancer, *Biken J* (Band 21), Nr. 2, Seite 37-49
- [147] Gross, S. (1971): Measles and leukaemia, *Lancet* (Band 1), Nr. 7695, Seite 397-8
- [148] Cassel, W. A. und Garrett, R. E. (1965): Newcastle Disease Virus as an Antineoplastic Agent, *Cancer* (Band 18), Seite 863-8
- [149] He, T. C.; Zhou, S.; da Costa, L. T.; Yu, J.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 5, Seite 2509-14
- [150] Hitt, M. M. und Graham, F. L. (1990): Adenovirus E1A under the control of heterologous promoters: wide variation in E1A expression levels has little effect on virus replication, *Virology* (Band 179), Nr. 2, Seite 667-78
- [151] Lieber, A.; He, C. Y.; Kirillova, I. und Kay, M. A. (1996): Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo, *J Virol* (Band 70), Nr. 12, Seite 8944-60
- [152] Gao, G. P.; Yang, Y. und Wilson, J. M. (1996): Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy, *J Virol* (Band 70), Nr. 12, Seite 8934-43
- [153] Chen, H. H.; Mack, L. M.; Kelly, R.; Ontell, M.; Kochanek, S. und Clemens, P. R. (1997): Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 5, Seite 1645-50
- [154] Schiedner, G.; Morral, N.; Parks, R. J.; Wu, Y.; Koopmans, S. C.; Langston, C., et al. (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity, *Nat Genet* (Band 18), Nr. 2, Seite 180-3
- [155] Morsy, M. A.; Gu, M.; Motzel, S.; Zhao, J.; Lin, J.; Su, Q., et al. (1998): An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 14, Seite 7866-71
- [156] Yang, Y.; Nunes, F. A.; Berencsi, K.; Furth, E. E.; Gonczol, E. und Wilson, J. M. (1994): Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 10, Seite 4407-11
- [157] Eck, S. L.; Alavi, J. B.; Alavi, A.; Davis, A.; Hackney, D.; Judy, K., et al. (1996): Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial, *Hum Gene Ther* (Band 7), Nr. 12, Seite 1465-82
- [158] Lang, F. F.; Bruner, J. M.; Fuller, G. N.; Aldape, K.; Prados, M. D.; Chang, S., et al. (2003): Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results, *J Clin Oncol* (Band 21), Nr. 13, Seite 2508-18
- [159] Russell, W. C. (2000): Update on adenovirus and its vectors, *J Gen Virol* (Band 81), Nr. Pt 11, Seite 2573-604
- [160] Vorburger, S. A. und Hunt, K. K. (2002): Adenoviral gene therapy, *Oncologist* (Band 7), Nr. 1, Seite 46-59
- [161] Curiel, D. T. (2000): The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy, *Clin Cancer Res* (Band 6), Nr. 9, Seite 3395-9

- [162] Dobbelstein, M. (2004): Replicating adenoviruses in cancer therapy, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 273), Seite 291-334
- [163] Loser, P.; Jennings, G. S.; Strauss, M. und Sandig, V. (1998): Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB, *J Virol* (Band 72), Nr. 1, Seite 180-90
- [164] Lusky, M.; Grave, L.; Dieterle, A.; Dreyer, D.; Christ, M.; Ziller, C., et al. (1999): Regulation of adenovirus-mediated transgene expression by the viral E4 gene products: requirement for E4 ORF3, *J Virol* (Band 73), Nr. 10, Seite 8308-19
- [165] Bischoff, J. R.; Kirn, D. H.; Williams, A.; Heise, C.; Horn, S.; Muna, M., et al. (1996): An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells, *Science* (Band 274), Nr. 5286, Seite 373-6
- [166] Ganly, I.; Kirn, D.; Eckhardt, G.; Rodriguez, G. I.; Soutar, D. S.; Otto, R., et al. (2000): A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer, *Clin Cancer Res* (Band 6), Nr. 3, Seite 798-806
- [167] Heise, C.; Sampson-Johannes, A.; Williams, A.; McCormick, F.; Von Hoff, D. D. und Kirn, D. H. (1997): ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents, *Nat Med* (Band 3), Nr. 6, Seite 639-45
- [168] Khuri, F. R.; Nemunaitis, J.; Ganly, I.; Arseneau, J.; Tannock, I. F.; Romel, L., et al. (2000): a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer, *Nat Med* (Band 6), Nr. 8, Seite 879-85
- [169] Nemunaitis, J.; Cunningham, C.; Buchanan, A.; Blackburn, A.; Edelman, G.; Maples, P., et al. (2001): Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity, *Gene Ther* (Band 8), Nr. 10, Seite 746-59
- [170] Rogulski, K. R.; Freytag, S. O.; Zhang, K.; Gilbert, J. D.; Paielli, D. L.; Kim, J. H., et al. (2000): In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 5, Seite 1193-6
- [171] Goldsmith, K. T.; Dion, L. D.; Curiel, D. T. und Garver, R. I., Jr. (1998): trans E1 component requirements for maximal replication of E1-defective recombinant adenovirus, *Virology* (Band 248), Nr. 2, Seite 406-19
- [172] Harada, J. N. und Berk, A. J. (1999): p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication, *J Virol* (Band 73), Nr. 7, Seite 5333-44
- [173] Hay, J. G.; McElvaney, N. G.; Herena, J. und Crystal, R. G. (1995): Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector, *Hum Gene Ther* (Band 6), Nr. 11, Seite 1487-96
- [174] Vollmer, C. M.; Ribas, A.; Butterfield, L. H.; Dissette, V. B.; Andrews, K. J.; Eilber, F. C., et al. (1999): p53 selective and nonselective replication of an E1B-deleted adenovirus in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res* (Band 59), Nr. 17, Seite 4369-74
- [175] Wildner, O. und Morris, J. C. (2000): Therapy of peritoneal carcinomatosis from colon cancer with oncolytic adenoviruses, *J Gene Med* (Band 2), Nr. 5, Seite 353-60
- [176] Chiocca, E. A.; Abbed, K. M.; Tatter, S.; Louis, D. N.; Hochberg, F. H.; Barker, F., et al. (2004): A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting, *Mol Ther* (Band 10), Nr. 5, Seite 958-66
- [177] Heise, C.; Hermiston, T.; Johnson, L.; Brooks, G.; Sampson-Johannes, A.; Williams, A., et al. (2000): An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy, *Nat Med* (Band 6), Nr. 10, Seite 1134-9
- [178] Holm, P. S.; Bergmann, S.; Jurchott, K.; Lage, H.; Brand, K.; Ladhoff, A., et al. (2002): YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 12, Seite 10427-34

- [179] Hallenbeck, P. L.; Chang, Y. N.; Hay, C.; Golightly, D.; Stewart, D.; Lin, J., et al. (1999): A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma, *Hum Gene Ther* (Band 10), Nr. 10, Seite 1721-33
- [180] Rodriguez, R.; Schuur, E. R.; Lim, H. Y.; Henderson, G. A.; Simons, J. W. und Henderson, D. R. (1997): Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 13, Seite 2559-63
- [181] Kurihara, H.; Zama, A.; Tamura, M.; Takeda, J.; Sasaki, T. und Takeuchi, T. (2000): Glioma/glioblastoma-specific adenoviral gene expression using the nestin gene regulator, *Gene Ther* (Band 7), Nr. 8, Seite 686-93
- [182] Alemany, R.; Lai, S.; Lou, Y. C.; Jan, H. Y.; Fang, X. und Zhang, W. W. (1999): Complementary adenoviral vectors for oncolysis, *Cancer Gene Ther* (Band 6), Nr. 1, Seite 21-5
- [183] Hernandez-Alcoceba, R.; Pihlaja, M.; Wicha, M. S. und Clarke, M. F. (2000): A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors, *Hum Gene Ther* (Band 11), Nr. 14, Seite 2009-24
- [184] Brunori, M.; Malerba, M.; Kashiwazaki, H. und Iggo, R. (2001): Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway, *J Virol* (Band 75), Nr. 6, Seite 2857-65
- [185] Doronin, K.; Toth, K.; Kuppaswamy, M.; Ward, P.; Tollefson, A. E. und Wold, W. S. (2000): Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein, *J Virol* (Band 74), Nr. 13, Seite 6147-55
- [186] Bergelson, J. M.; Cunningham, J. A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E. A.; Krithivas, A.; Hong, J. S., et al. (1997): Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science* (Band 275), Nr. 5304, Seite 1320-3
- [187] Tomko, R. P.; Xu, R. und Philipson, L. (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 7, Seite 3352-6
- [188] Honda, T.; Saitoh, H.; Masuko, M.; Katagiri-Abe, T.; Tominaga, K.; Kozakai, I., et al. (2000): The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain, *Brain Res Mol Brain Res* (Band 77), Nr. 1, Seite 19-28
- [189] Miller, C. R.; Buchsbaum, D. J.; Reynolds, P. N.; Douglas, J. T.; Gillespie, G. Y.; Mayo, M. S., et al. (1998): Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer, *Cancer Res* (Band 58), Nr. 24, Seite 5738-48
- [190] Lamfers, M. L.; Grill, J.; Dirven, C. M.; Van Beusechem, V. W.; Georger, B.; Van Den Berg, J., et al. (2002): Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy, *Cancer Res* (Band 62), Nr. 20, Seite 5736-42
- [191] Asaoka, K.; Tada, M.; Sawamura, Y.; Ikeda, J. und Abe, H. (2000): Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor, *J Neurosurg* (Band 92), Nr. 6, Seite 1002-8
- [192] Grill, J.; Van Beusechem, V. W.; Van Der Valk, P.; Dirven, C. M.; Leonhart, A.; Pherai, D. S., et al. (2001): Combined targeting of adenoviruses to integrins and epidermal growth factor receptors increases gene transfer into primary glioma cells and spheroids, *Clin Cancer Res* (Band 7), Nr. 3, Seite 641-50
- [193] Worgall, S.; Wolff, G.; Falck-Pedersen, E. und Crystal, R. G. (1997): Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration, *Hum Gene Ther* (Band 8), Nr. 1, Seite 37-44
- [194] Uhm, J. H.; Gladson, C. L. und Rao, J. S. (1999): The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas, *Front Biosci* (Band 4), Seite D188-99
- [195] Bello, L.; Lucini, V.; Giussani, C.; Carrabba, G.; Pluderi, M.; Scaglione, F., et al. (2003): IS201, a specific $\alpha v \beta 3$ integrin inhibitor, reduces glioma growth in vivo, *Neurosurgery* (Band 52), Nr. 1, Seite 177-85; discussion 185-6

- [196] Fueyo, J.; Alemany, R.; Gomez-Manzano, C.; Fuller, G. N.; Khan, A.; Conrad, C. A., et al. (2003): Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway, *J Natl Cancer Inst* (Band 95), Nr. 9, Seite 652-60
- [197] Hidaka, C.; Milano, E.; Leopold, P. L.; Bergelson, J. M.; Hackett, N. R.; Finberg, R. W., et al. (1999): CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts, *J Clin Invest* (Band 103), Nr. 4, Seite 579-87
- [198] Kirn, D.; Martuza, R. L. und Zwiebel, J. (2001): Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions, *Nat Med* (Band 7), Nr. 7, Seite 781-7
- [199] Sauthoff, H.; Heitner, S.; Rom, W. N. und Hay, J. G. (2000): Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector, *Hum Gene Ther* (Band 11), Nr. 3, Seite 379-88
- [200] Jones, N. und Shenk, T. (1978): Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5, *Cell* (Band 13), Nr. 1, Seite 181-8
- [201] Nevins, J. R. (1981): Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product, *Cell* (Band 26), Nr. 2 Pt 2, Seite 213-20
- [202] Rognoni, E.; Widmaier, M.; Haczek, C.; Mantwill, K.; Holzmüller, R.; Gansbacher, B., et al. (2009): Adenovirus-based virotherapy enabled by cellular YB-1 expression in vitro and in vivo, *Cancer Gene Ther* (Band 16), Nr. 10, Seite 753-63
- [203] Wood, K. J. und Fry, J. (1999): Gene therapy: potential applications in clinical transplantation, *Expert Rev Mol Med* (Band 1999), Seite 1-20
- [204] Koizumi, N.; Mizuguchi, H.; Utoguchi, N.; Watanabe, Y. und Hayakawa, T. (2003): Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob, *J Gene Med* (Band 5), Nr. 4, Seite 267-76
- [205] Dmitriev, I.; Krasnykh, V.; Miller, C. R.; Wang, M.; Kashentseva, E.; Mikheeva, G., et al. (1998): An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism, *J Virol* (Band 72), Nr. 12, Seite 9706-13
- [206] Nagel, H.; Maag, S.; Tassis, A.; Nestle, F. O.; Greber, U. F. und Hemmi, S. (2003): The alphavbeta5 integrin of hematopoietic and nonhematopoietic cells is a transduction receptor of RGD-4C fiber-modified adenoviruses, *Gene Ther* (Band 10), Nr. 19, Seite 1643-53
- [207] Liu, T. C.; Hallden, G.; Wang, Y.; Brooks, G.; Francis, J.; Lemoine, N., et al. (2004): An E1B-19 kDa gene deletion mutant adenovirus demonstrates tumor necrosis factor-enhanced cancer selectivity and enhanced oncolytic potency, *Mol Ther* (Band 9), Nr. 6, Seite 786-803
- [208] Haley, K. P.; Overhauser, J.; Babiss, L. E.; Ginsberg, H. S. und Jones, N. C. (1984): Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 81), Nr. 18, Seite 5734-8
- [209] Braithwaite, A. W.; Nelson, C. C. und Bellett, A. J. (1991): E1a revisited: the case for multiple cooperative trans-activation domains, *New Biol* (Band 3), Nr. 1, Seite 18-26
- [210] Lillie, J. W.; Loewenstein, P. M.; Green, M. R. und Green, M. (1987): Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins, *Cell* (Band 50), Nr. 7, Seite 1091-100
- [211] Mymryk, J. S. und Bayley, S. T. (1994): Multiple pathways for activation of E2A expression in human KB cells by the 243R E1A protein of adenovirus type 5, *Virus Res* (Band 33), Nr. 1, Seite 89-97
- [212] Wong, H. K. und Ziff, E. B. (1994): Complementary functions of E1a conserved region 1 cooperate with conserved region 3 to activate adenovirus serotype 5 early promoters, *J Virol* (Band 68), Nr. 8, Seite 4910-20
- [213] Bieler, A.; Mantwill, K.; Holzmüller, R.; Jurchott, K.; Kaszubiak, A.; Stark, S., et al. (2008): Impact of radiation therapy on the oncolytic adenovirus dl520: implications on the treatment of glioblastoma, *Radiother Oncol* (Band 86), Nr. 3, Seite 419-27
- [214] Holm, P. S.; Lage, H.; Bergmann, S.; Jurchott, K.; Glockzin, G.; Bernshausen, A., et al. (2004): Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy, *Cancer Res* (Band 64), Nr. 1, Seite 322-8

- [215] Bieler, A.; Mantwill, K.; Dravits, T.; Bernshausen, A.; Glockzin, G.; Kohler-Vargas, N., et al. (2006): Novel three-pronged strategy to enhance cancer cell killing in glioblastoma cell lines: histone deacetylase inhibitor, chemotherapy, and oncolytic adenovirus dl520, *Hum Gene Ther* (Band 17), Nr. 1, Seite 55-70
- [216] Holzmüller, R.; Mantwill, K.; Haczek, C.; Rognoni, E.; Anton, M.; Kasajima, A., et al. (2010): YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma, *Int J Cancer*
- [217] Didier, D. K.; Schiffenbauer, J.; Woulfe, S. L.; Zacheis, M. und Schwartz, B. D. (1988): Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 85), Nr. 19, Seite 7322-6
- [218] Kohno, K.; Izumi, H.; Uchiumi, T.; Ashizuka, M. und Kuwano, M. (2003): The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1, *Bioessays* (Band 25), Nr. 7, Seite 691-8
- [219] Kloks, C. P.; Spronk, C. A.; Lasonder, E.; Hoffmann, A.; Vuister, G. W.; Grzesiek, S., et al. (2002): The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1, *J Mol Biol* (Band 316), Nr. 2, Seite 317-26
- [220] Izumi, H.; Imamura, T.; Nagatani, G.; Ise, T.; Murakami, T.; Uramoto, H., et al. (2001): Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity, *Nucleic Acids Res* (Band 29), Nr. 5, Seite 1200-7
- [221] Koike, K.; Uchiumi, T.; Ohga, T.; Toh, S.; Wada, M.; Kohno, K., et al. (1997): Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation, *FEBS Lett* (Band 417), Nr. 3, Seite 390-4
- [222] Uchiumi, T.; Kohno, K.; Tanimura, H.; Matsuo, K.; Sato, S.; Uchida, Y., et al. (1993): Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation, *Cell Growth Differ* (Band 4), Nr. 3, Seite 147-57
- [223] Stein, U.; Jurchott, K.; Walther, W.; Bergmann, S.; Schlag, P. M. und Royer, H. D. (2001): Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 30, Seite 28562-9
- [224] Yahata, H.; Kobayashi, H.; Kamura, T.; Amada, S.; Hirakawa, T.; Kohno, K., et al. (2002): Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer, *J Cancer Res Clin Oncol* (Band 128), Nr. 11, Seite 621-6
- [225] Shibahara, K.; Sugio, K.; Osaki, T.; Uchiumi, T.; Maehara, Y.; Kohno, K., et al. (2001): Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res* (Band 7), Nr. 10, Seite 3151-5
- [226] Oda, Y.; Sakamoto, A.; Shinohara, N.; Ohga, T.; Uchiumi, T.; Kohno, K., et al. (1998): Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma, *Clin Cancer Res* (Band 4), Nr. 9, Seite 2273-7
- [227] Oda, Y.; Ohishi, Y.; Saito, T.; Hinoshita, E.; Uchiumi, T.; Kinukawa, N., et al. (2003): Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma, *J Pathol* (Band 199), Nr. 2, Seite 251-8
- [228] Faury, D.; Nantel, A.; Dunn, S. E.; Guiot, M. C.; Haque, T.; Hauser, P., et al. (2007): Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors, *J Clin Oncol* (Band 25), Nr. 10, Seite 1196-208
- [229] Shibao, K.; Takano, H.; Nakayama, Y.; Okazaki, K.; Nagata, N.; Izumi, H., et al. (1999): Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas, *Int J Cancer* (Band 83), Nr. 6, Seite 732-7
- [230] Fujii, T.; Kawahara, A.; Basaki, Y.; Hattori, S.; Nakashima, K.; Nakano, K., et al. (2008): Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers, *Cancer Res* (Band 68), Nr. 5, Seite 1504-12
- [231] Fujita, T.; Ito, K.; Izumi, H.; Kimura, M.; Sano, M.; Nakagomi, H., et al. (2005): Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel, *Clin Cancer Res* (Band 11), Nr. 24 Pt 1, Seite 8837-44

- [232] Janz, M.; Harbeck, N.; Dettmar, P.; Berger, U.; Schmidt, A.; Jurchott, K., et al. (2002): Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1, *Int J Cancer* (Band 97), Nr. 3, Seite 278-82
- [233] Kamura, T.; Yahata, H.; Amada, S.; Ogawa, S.; Sonoda, T.; Kobayashi, H., et al. (1999): Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma?, *Cancer* (Band 85), Nr. 11, Seite 2450-4
- [234] Oda, Y.; Ohishi, Y.; Basaki, Y.; Kobayashi, H.; Hirakawa, T.; Wake, N., et al. (2007): Prognostic implications of the nuclear localization of Y-box-binding protein-1 and CXCR4 expression in ovarian cancer: their correlation with activated Akt, LRP/MVP and P-glycoprotein expression, *Cancer Sci* (Band 98), Nr. 7, Seite 1020-6
- [235] Gimenez-Bonafe, P.; Fedoruk, M. N.; Whitmore, T. G.; Akbari, M.; Ralph, J. L.; Ettinger, S., et al. (2004): YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity, *Prostate* (Band 59), Nr. 3, Seite 337-49
- [236] Uchiumi, T.; Fotovati, A.; Sasaguri, T.; Shibahara, K.; Shimada, T.; Fukuda, T., et al. (2006): YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 52, Seite 40440-9
- [237] Takahashi, M.; Shimajiri, S.; Izumi, H.; Hirano, G.; Kashiwagi, E.; Yasuniwa, Y., et al. (2010): Y-box binding protein-1 is a novel molecular target for tumor vessels, *Cancer Sci* (Band 101), Nr. 6, Seite 1367-73
- [238] Kuwano, M.; Uchiumi, T.; Hayakawa, H.; Ono, M.; Wada, M.; Izumi, H., et al. (2003): The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies, *Cancer Sci* (Band 94), Nr. 1, Seite 9-14
- [239] Jurchott, K.; Bergmann, S.; Stein, U.; Walther, W.; Janz, M.; Manni, I., et al. (2003): YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 30, Seite 27988-96
- [240] Ohga, T.; Uchiumi, T.; Makino, Y.; Koike, K.; Wada, M.; Kuwano, M., et al. (1998): Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 11, Seite 5997-6000
- [241] Ladomery, M. und Sommerville, J. (1995): A role for Y-box proteins in cell proliferation, *Bioessays* (Band 17), Nr. 1, Seite 9-11
- [242] Coles, L. S.; Diamond, P.; Occhiodoro, F.; Vadas, M. A. und Shannon, M. F. (1996): Cold shock domain proteins repress transcription from the GM-CSF promoter, *Nucleic Acids Res* (Band 24), Nr. 12, Seite 2311-7
- [243] Okamoto, T.; Izumi, H.; Imamura, T.; Takano, H.; Ise, T.; Uchiumi, T., et al. (2000): Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression, *Oncogene* (Band 19), Nr. 54, Seite 6194-202
- [244] Li, W. W.; Hsiung, Y.; Wong, V.; Galvin, K.; Zhou, Y.; Shi, Y., et al. (1997): Suppression of grp78 core promoter element-mediated stress induction by the dbpA and dbpB (YB-1) cold shock domain proteins, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 1, Seite 61-8
- [245] Mertens, P. R.; Harendza, S.; Pollock, A. S. und Lovett, D. H. (1997): Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 36, Seite 22905-12
- [246] Lasham, A.; Lindridge, E.; Rudert, F.; Onrust, R. und Watson, J. (2000): Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors, *Gene* (Band 252), Nr. 1-2, Seite 1-13
- [247] MacDonald, G. H.; Itoh-Lindstrom, Y. und Ting, J. P. (1995): The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 8, Seite 3527-33
- [248] Ohmori, M.; Shimura, H.; Shimura, Y. und Kohn, L. D. (1996): A Y-box protein is a suppressor factor that decreases thyrotropin receptor gene expression, *Mol Endocrinol* (Band 10), Nr. 1, Seite 76-89
- [249] Evdokimova, V. M.; Kovrigina, E. A.; Nashchekin, D. V.; Davydova, E. K.; Hershey, J. W. und Ovchinnikov, L. P. (1998): The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles

- (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 6, Seite 3574-81
- [250] Sommerville, J. (1999): Activities of cold-shock domain proteins in translation control, *Bioessays* (Band 21), Nr. 4, Seite 319-25
- [251] Stickeler, E.; Fraser, S. D.; Honig, A.; Chen, A. L.; Berget, S. M. und Cooper, T. A. (2001): The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4, *EMBO J* (Band 20), Nr. 14, Seite 3821-30
- [252] Evdokimova, V.; Ruzanov, P.; Imataka, H.; Raught, B.; Svitkin, Y.; Ovchinnikov, L. P., et al. (2001): The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer, *EMBO J* (Band 20), Nr. 19, Seite 5491-502
- [253] Bouvet, P.; Matsumoto, K. und Wolffe, A. P. (1995): Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 47, Seite 28297-303
- [254] Ashizuka, M.; Fukuda, T.; Nakamura, T.; Shirasuna, K.; Iwai, K.; Izumi, H., et al. (2002): Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2, *Mol Cell Biol* (Band 22), Nr. 18, Seite 6375-83
- [255] Kohno, K.; Uchiumi, T.; Niina, I.; Wakasugi, T.; Igarashi, T.; Momii, Y., et al. (2005): Transcription factors and drug resistance, *Eur J Cancer* (Band 41), Nr. 16, Seite 2577-86
- [256] Ohga, T.; Koike, K.; Ono, M.; Makino, Y.; Itagaki, Y.; Tanimoto, M., et al. (1996): Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light, *Cancer Res* (Band 56), Nr. 18, Seite 4224-8
- [257] Gao, Y.; Fotovati, A.; Lee, C.; Wang, M.; Cote, G.; Guns, E., et al. (2009): Inhibition of Y-box binding protein-1 slows the growth of glioblastoma multiforme and sensitizes to temozolomide independent O6-methylguanine-DNA methyltransferase, *Mol Cancer Ther* (Band 8), Nr. 12, Seite 3276-84
- [258] Faber, M. und Sealy, L. (1990): Rous sarcoma virus enhancer factor I is a ubiquitous CCAAT transcription factor highly related to CBF and NF-Y, *J Biol Chem* (Band 265), Nr. 36, Seite 22243-54
- [259] Spitkovskii, D. D.; Roier, G. D.; Mazurenko, N. N.; Mikhaleva, I.; Prudchenko, I. A.; Korbukh, I. A., et al. (1993): [In vivo identification of YB-1 protein, interacting with the enhancer of human papillomavirus (HPV) type 18, using antibodies to a synthetic peptide], *Mol Biol (Mosk)* (Band 27), Nr. 1, Seite 81-91
- [260] Raj, G. V.; Safak, M.; MacDonald, G. H. und Khalili, K. (1996): Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box-binding protein, YB-1, *J Virol* (Band 70), Nr. 9, Seite 5944-53
- [261] Whyte, P.; Buchkovich, K. J.; Horowitz, J. M.; Friend, S. H.; Raybuck, M.; Weinberg, R. A., et al. (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product, *Nature* (Band 334), Nr. 6178, Seite 124-9
- [262] Kovcsdi, I.; Reichel, R. und Nevins, J. R. (1987): Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 8, Seite 2180-4
- [263] Swaminathan, S. und Thimmapaya, B. (1995): Regulation of adenovirus E2 transcription unit, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 199 (Pt 3)), Seite 177-94
- [264] O'Connor, R. J. und Hearing, P. (2000): The E4-6/7 protein functionally compensates for the loss of E1A expression in adenovirus infection, *J Virol* (Band 74), Nr. 13, Seite 5819-24
- [265] Mantwill, K.; Kohler-Vargas, N.; Bernshausen, A.; Bieler, A.; Lage, H.; Kaszubiak, A., et al. (2006): Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus: implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents, *Cancer Res* (Band 66), Nr. 14, Seite 7195-202
- [266] Steinwaerder, D. S.; Carlson, C. A. und Lieber, A. (2000): DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells, *Hum Gene Ther* (Band 11), Nr. 13, Seite 1933-48
- [267] Goding, C. R.; Temperley, S. M. und Fisher, F. (1987): Multiple transcription factors interact with the adenovirus-2 E1-late promoter: evidence for a novel CCAAT recognition factor, *Nucleic Acids Res* (Band 15), Nr. 19, Seite 7761-80

- [268] Lu, H.; Reach, M. D.; Minaya, E. und Young, C. S. (1997): The initiator element of the adenovirus major late promoter has an important role in transcription initiation in vivo, *J Virol* (Band 71), Nr. 1, Seite 102-9
- [269] Guilfoyle, R. A.; Osherooff, W. P. und Rossini, M. (1985): Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsible for the activation and repression of the DNA-binding protein gene, *EMBO J* (Band 4), Nr. 3, Seite 707-13
- [270] Song, B. und Young, C. S. (1998): Functional analysis of the CAAT box in the major late promoter of the subgroup C human adenoviruses, *J Virol* (Band 72), Nr. 4, Seite 3213-20
- [271] Lage, H.; Surowiak, P. und Holm, P. S. (2008): [YB-1 as a potential target in cancer therapy], *Pathologe* (Band 29 Suppl 2), Seite 187-90
- [272] Ishii, N.; Maier, D.; Merlo, A.; Tada, M.; Sawamura, Y.; Diserens, A. C., et al. (1999): Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines, *Brain Pathol* (Band 9), Nr. 3, Seite 469-79
- [273] HealthProtectionAgencyCultureCollections(HPA) (2011): Cross-Contaminated & Misidentified Cell Lines, Queries, 3. Identification.
<http://www.hpacultures.org.uk/services/celllineidentityverification/misidentifiedcelllines.jsp>, Stand: 15.10.2011
- [274] Moran, L. R.; Cincotta, T.; Krishnamoorthy, K. und Insoft, R. M. (2005): The use of baclofen in full-term neonates with hypertonia, *J Perinatol* (Band 25), Nr. 1, Seite 66-8
- [275] Ponten, J. und Macintyre, E. H. (1968): Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathol Microbiol Scand* (Band 74), Nr. 4, Seite 465-86
- [276] Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. und Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol* (Band 36), Nr. 1, Seite 59-74
- [277] Louis, N.; Eveleigh, C. und Graham, F. L. (1997): Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line, *Virology* (Band 233), Nr. 2, Seite 423-9
- [278] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1988), *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 1., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- [279] von Marschall, Z.; Cramer, T.; Hocker, M.; Finkenzeller, G.; Wiedenmann, B. und Rosewicz, S. (2001): Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma, *Gut* (Band 48), Nr. 1, Seite 87-96
- [280] Kunz, F.; Shalaby, T.; Lang, D.; von Buren, A.; Hainfellner, J. A.; Slavc, I., et al. (2006): Quantitative mRNA expression analysis of neurotrophin-receptor TrkC and oncogene c-MYC from formalin-fixed, paraffin-embedded primitive neuroectodermal tumor samples, *Neuropathology* (Band 26), Nr. 5, Seite 393-9
- [281] Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V. K.; Mukherjee, S.; Ebert, B. L.; Gillette, M. A., et al. (2005): Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 43, Seite 15545-50
- [282] Kanehisa, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Aoki-Kinoshita, K. F.; Itoh, M.; Kawashima, S., et al. (2006): From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG, *Nucleic Acids Res* (Band 34), Nr. Database issue, Seite D354-7
- [283] Kanehisa, M. und Goto, S. (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res* (Band 28), Nr. 1, Seite 27-30
- [284] Brentani, H.; Caballero, O. L.; Camargo, A. A.; da Silva, A. M.; da Silva, W. A., Jr.; Dias Neto, E., et al. (2003): The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 23, Seite 13418-23
- [285] Grimson, A.; Farh, K. K.; Johnston, W. K.; Garrett-Engle, P.; Lim, L. P. und Bartel, D. P. (2007): MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing, *Mol Cell* (Band 27), Nr. 1, Seite 91-105
- [286] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-5

- [287] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D., et al. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst* (Band 82), Nr. 13, Seite 1107-12
- [288] Perez, R. P.; Godwin, A. K.; Handel, L. M. und Hamilton, T. C. (1993): A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines, *Eur J Cancer* (Band 29A), Nr. 3, Seite 395-9
- [289] SABiosciencesCorporation (2009): Cignal™ Reporter Assay Kits, Cell-Based Pathway Activity Assays Frederick, USA, 9, Version 1.6, User Manual
- [290] Greer, L. F., 3rd und Szalay, A. A. (2002): Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review, *Luminescence* (Band 17), Nr. 1, Seite 43-74
- [291] Grimm, D.; Kern, A.; Pawlita, M.; Ferrari, F.; Samulski, R. und Kleinschmidt, J. (1999): Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2, *Gene Ther* (Band 6), Nr. 7, Seite 1322-30
- [292] Lochmuller, H.; Jani, A.; Huard, J.; Prescott, S.; Simoneau, M.; Massie, B., et al. (1994): Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells, *Hum Gene Ther* (Band 5), Nr. 12, Seite 1485-91
- [293] Motoyama, K.; Inoue, H.; Takatsuno, Y.; Tanaka, F.; Mimori, K.; Uetake, H., et al. (2009): Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer, *Int J Oncol* (Band 34), Nr. 4, Seite 1069-75
- [294] Woods, K.; Thomson, J. M. und Hammond, S. M. (2007): Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 4, Seite 2130-4
- [295] He, L.; Thomson, J. M.; Hemann, M. T.; Hernando-Monge, E.; Mu, D.; Goodson, S., et al. (2005): A microRNA polycistron as a potential human oncogene, *Nature* (Band 435), Nr. 7043, Seite 828-33
- [296] Lu, Y.; Ryan, S. L.; Elliott, D. J.; Bignell, G. R.; Futreal, P. A.; Ellison, D. W., et al. (2009): Amplification and overexpression of Hsa-miR-30b, Hsa-miR-30d and KHDRBS3 at 8q24.22-q24.23 in medulloblastoma, *PLoS One* (Band 4), Nr. 7, Seite e6159
- [297] Yu, F.; Deng, H.; Yao, H.; Liu, Q.; Su, F. und Song, E. (2010): Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells, *Oncogene* (Band 29), Nr. 29, Seite 4194-204
- [298] Rodriguez-Gonzalez, F. G.; Sieuwerts, A. M.; Smid, M.; Look, M. P.; Meijer-van Gelder, M. E.; de Weerd, V., et al. (2010): MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogen receptor positive breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*
- [299] Ichimi, T.; Enokida, H.; Okuno, Y.; Kunitomo, R.; Chiyomaru, T.; Kawamoto, K., et al. (2009): Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer, *Int J Cancer* (Band 125), Nr. 2, Seite 345-52
- [300] Braun, J.; Hoang-Vu, C.; Dralle, H. und Huttelmaier, S. (2010): Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas, *Oncogene* (Band 29), Nr. 29, Seite 4237-44
- [301] Qi, Y.; Tu, J.; Cui, L.; Guo, X.; Shi, Z.; Li, S., et al. (2010): High-throughput sequencing of microRNAs in adenovirus type 3 infected human laryngeal epithelial cells, *J Biomed Biotechnol* (Band 2010), Seite 915980
- [302] Chao, T. F.; Zhang, Y.; Yan, X. Q.; Yin, B.; Gong, Y. H.; Yuan, J. G., et al. (2008): [MiR-9 regulates the expression of CBX7 in human glioma], *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* (Band 30), Nr. 3, Seite 268-74
- [303] Mehta, A. C.; Stelmach, K. und Khalil, H. Y. (1992): Insertion of a pre-SCOOP transtracheal oxygen therapy catheter with use of a Raulerson syringe, *Chest* (Band 101), Nr. 3, Seite 887-8
- [304] Fei, J.; Lan, F.; Guo, M.; Li, Y. und Liu, Y. (2008): Inhibitory effects of anti-miRNA oligonucleotides (AMOs) on A549 cell growth, *J Drug Target* (Band 16), Nr. 9, Seite 688-93

- [305] Xia, H.; Qi, Y.; Ng, S. S.; Chen, X.; Chen, S.; Fang, M., et al. (2009): MicroRNA-15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 380), Nr. 2, Seite 205-10
- [306] Zhang, Y.; Li, M.; Wang, H.; Fisher, W. E.; Lin, P. H.; Yao, Q., et al. (2009): Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis, *World J Surg* (Band 33), Nr. 4, Seite 698-709
- [307] Wang, X.; Tang, S.; Le, S. Y.; Lu, R.; Rader, J. S.; Meyers, C., et al. (2008): Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth, *PLoS One* (Band 3), Nr. 7, Seite e2557
- [308] Su, J. L.; Chen, P. B.; Chen, Y. H.; Chen, S. C.; Chang, Y. W.; Jan, Y. H., et al. (2010): Downregulation of microRNA miR-520h by E1A contributes to anticancer activity, *Cancer Res* (Band 70), Nr. 12, Seite 5096-108
- [309] Liu, L.; Chen, L.; Xu, Y.; Li, R. und Du, X. (2010): microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun*
- [310] Guo, J.; Miao, Y.; Xiao, B.; Huan, R.; Jiang, Z.; Meng, D., et al. (2009): Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues, *J Gastroenterol Hepatol* (Band 24), Nr. 4, Seite 652-7
- [311] Ujifuku, K.; Mitsutake, N.; Takakura, S.; Matsuse, M.; Saenko, V.; Suzuki, K., et al. (2010): miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells, *Cancer Lett* (Band 296), Nr. 2, Seite 241-8
- [312] Jiang, L.; Mao, P.; Song, L.; Wu, J.; Huang, J.; Lin, C., et al. (2010): miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival, *Am J Pathol* (Band 177), Nr. 1, Seite 29-38
- [313] Sun, Y.; Fang, R.; Li, C.; Li, L.; Li, F.; Ye, X., et al. (2010): Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 396), Nr. 2, Seite 501-7
- [314] Sarver, A. L.; French, A. J.; Borralho, P. M.; Thayanithy, V.; Oberg, A. L.; Silverstein, K. A., et al. (2009): Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states, *BMC Cancer* (Band 9), Seite 401
- [315] Schaefer, A.; Jung, M.; Mollenkopf, H. J.; Wagner, I.; Stephan, C.; Jentzmik, F., et al. (2010): Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma, *Int J Cancer* (Band 126), Nr. 5, Seite 1166-76
- [316] Massague, J. (1998): TGF-beta signal transduction, *Annu Rev Biochem* (Band 67), Seite 753-91
- [317] Ramalingam, R.; Rafii, S.; Worgall, S.; Hackett, N. R. und Crystal, R. G. (1999): Induction of endogenous genes following infection of human endothelial cells with an E1(-) E4(+) adenovirus gene transfer vector, *J Virol* (Band 73), Nr. 12, Seite 10183-90
- [318] Clesham, G. J.; Adam, P. J.; Proudfoot, D.; Flynn, P. D.; Efstathiou, S. und Weissberg, P. L. (1998): High adenoviral loads stimulate NF kappaB-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells, *Gene Ther* (Band 5), Nr. 2, Seite 174-80
- [319] Lieber, A.; He, C. Y.; Meuse, L.; Schowalter, D.; Kirillova, I.; Winther, B., et al. (1997): The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors, *J Virol* (Band 71), Nr. 11, Seite 8798-807
- [320] McElvaney, N. G. und Crystal, R. G. (1995): IL-6 release and airway administration of human CFR cDNA adenovirus vector, *Nat Med* (Band 1), Nr. 3, Seite 182-4
- [321] Newman, K. D.; Dunn, P. F.; Owens, J. W.; Schulick, A. H.; Virmani, R.; Sukhova, G., et al. (1995): Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia, *J Clin Invest* (Band 96), Nr. 6, Seite 2955-65
- [322] Zhao, H.; Granberg, F.; Elfineh, L.; Pettersson, U. und Svensson, C. (2003): Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection, *J Virol* (Band 77), Nr. 20, Seite 11006-15

- [323] Stilwell, J. L.; McCarty, D. M.; Negishi, A.; Superfine, R. und Samulski, R. J. (2003): Development and characterization of novel empty adenovirus capsids and their impact on cellular gene expression, *J Virol* (Band 77), Nr. 23, Seite 12881-5
- [324] Del Valle, L.; Azizi, S. A.; Krynska, B.; Enam, S.; Croul, S. E. und Khalili, K. (2000): Reactivation of human neurotropic JC virus expressing oncogenic protein in a recurrent glioblastoma multiforme, *Ann Neurol* (Band 48), Nr. 6, Seite 932-6
- [325] Jelsma, T. N.; Howe, J. A.; Eveleigh, C. M.; Cunniff, N. F.; Skiadopoulos, M. H.; Floroff, M. R., et al. (1988): Use of deletion and point mutants spanning the coding region of the adenovirus 5 E1A gene to define a domain that is essential for transcriptional activation, *Virology* (Band 163), Nr. 2, Seite 494-502
- [326] Leff, T.; Elkaim, R.; Goding, C. R.; Jalinot, P.; Sassone-Corsi, P.; Perricaudet, M., et al. (1984): Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1a mRNAs stimulate viral E1a and E1II expression at the transcriptional level, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 81), Nr. 14, Seite 4381-5
- [327] Granberg, F.; Svensson, C.; Pettersson, U. und Zhao, H. (2005): Modulation of host cell gene expression during onset of the late phase of an adenovirus infection is focused on growth inhibition and cell architecture, *Virology* (Band 343), Nr. 2, Seite 236-45
- [328] Zhao, H.; Granberg, F. und Pettersson, U. (2007): How adenovirus strives to control cellular gene expression, *Virology* (Band 363), Nr. 2, Seite 357-75
- [329] Bridge, E. und Ketner, G. (1990): Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression, *Virology* (Band 174), Nr. 2, Seite 345-53
- [330] Corbin-Lickfett, K. A. und Bridge, E. (2003): Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression, *Virology* (Band 315), Nr. 1, Seite 234-44
- [331] Sarnow, P.; Hearing, P.; Anderson, C. W.; Halbert, D. N.; Shenk, T. und Levine, A. J. (1984): Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells, *J Virol* (Band 49), Nr. 3, Seite 692-700
- [332] Cuesta, R.; Xi, Q. und Schneider, R. J. (2000): Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F, *EMBO J* (Band 19), Nr. 13, Seite 3465-74
- [333] Farley, D. C.; Brown, J. L. und Leppard, K. N. (2004): Activation of the early-late switch in adenovirus type 5 major late transcription unit expression by L4 gene products, *J Virol* (Band 78), Nr. 4, Seite 1782-91
- [334] Hayes, B. W.; Telling, G. C.; Myat, M. M.; Williams, J. F. und Flint, S. J. (1990): The adenovirus L4 100-kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species, *J Virol* (Band 64), Nr. 6, Seite 2732-42
- [335] Kovcsdi, I.; Reichel, R. und Nevins, J. R. (1986): Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation, *Cell* (Band 45), Nr. 2, Seite 219-28
- [336] Bayley ST, Mymryk JS (1994): Adenovirus E1A proteins and transformation, *Int J Oncology* (Band 5), Seite 425-444
- [337] Cobrinik, D. (1996): Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 208), Seite 31-61
- [338] Miller, D. L.; Myers, C. L.; Rickards, B.; Collier, H. A. und Flint, S. J. (2007): Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival, *Genome Biol* (Band 8), Nr. 4, Seite R58
- [339] He, L.; He, X.; Lowe, S. W. und Hannon, G. J. (2007): microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle, *Nat Rev Cancer* (Band 7), Nr. 11, Seite 819-22
- [340] Kent, O. A. und Mendell, J. T. (2006): A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes, *Oncogene* (Band 25), Nr. 46, Seite 6188-96
- [341] Ma, L.; Teruya-Feldstein, J. und Weinberg, R. A. (2007): Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer, *Nature* (Band 449), Nr. 7163, Seite 682-8
- [342] Mayr, C.; Hemann, M. T. und Bartel, D. P. (2007): Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation, *Science* (Band 315), Nr. 5818, Seite 1576-9

- [343] Esquela-Kerscher, A. und Slack, F. J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev Cancer* (Band 6), Nr. 4, Seite 259-69
- [344] Lu, S. und Cullen, B. R. (2004): Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis, *J Virol* (Band 78), Nr. 23, Seite 12868-76
- [345] Ylosmaki, E.; Hakkarainen, T.; Hemminki, A.; Visakorpi, T.; Andino, R. und Saksela, K. (2008): Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA, *J Virol* (Band 82), Nr. 22, Seite 11009-15
- [346] Das, S.; Chattopadhyay, R.; Bhakat, K. K.; Boldogh, I.; Kohno, K.; Prasad, R., et al. (2007): Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress, *J Biol Chem* (Band 282), Nr. 39, Seite 28474-84
- [347] de Souza-Pinto, N. C.; Mason, P. A.; Hashiguchi, K.; Weissman, L.; Tian, J.; Guay, D., et al. (2009): Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria, *DNA Repair (Amst)* (Band 8), Nr. 6, Seite 704-19
- [348] Gaudreault, I.; Guay, D. und Lebel, M. (2004): YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. 1, Seite 316-27
- [349] Enam, S.; Del Valle, L.; Lara, C.; Gan, D. D.; Ortiz-Hidalgo, C.; Palazzo, J. P., et al. (2002): Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin, *Cancer Res* (Band 62), Nr. 23, Seite 7093-101
- [350] Fujimuro, M. und Hayward, S. D. (2003): The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus manipulates the activity of glycogen synthase kinase-3beta, *J Virol* (Band 77), Nr. 14, Seite 8019-30
- [351] Morrison, J. A.; Klingelhutz, A. J. und Raab-Traub, N. (2003): Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells, *J Virol* (Band 77), Nr. 22, Seite 12276-84
- [352] Klagsbrun, M. und D'Amore, P. A. (1996): Vascular endothelial growth factor and its receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* (Band 7), Nr. 3, Seite 259-70
- [353] Yla-Herttuala, S.; Rissanen, T. T.; Vajanto, I. und Hartikainen, J. (2007): Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine, *J Am Coll Cardiol* (Band 49), Nr. 10, Seite 1015-26
- [354] Forsythe, J. A.; Jiang, B. H.; Iyer, N. V.; Agani, F.; Leung, S. W.; Koos, R. D., et al. (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, *Mol Cell Biol* (Band 16), Nr. 9, Seite 4604-13
- [355] Feldkamp, M. M.; Lau, N.; Rak, J.; Kerbel, R. S. und Guha, A. (1999): Normoxic and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by astrocytoma cells is mediated by Ras, *Int J Cancer* (Band 81), Nr. 1, Seite 118-24
- [356] Feigin, I.; Allen, L. B.; Lipkin, L. und Gross, S. W. (1958): The endothelial hyperplasia of the cerebral blood vessels with brain tumors, and its sarcomatous transformation, *Cancer* (Band 11), Nr. 2, Seite 264-77
- [357] Nystrom, S. (1960): Pathological changes in blood vessels of human glioblastoma multiforme. Comparative studies using plastic casting, angiography, light microscopy and electron microscopy, and with reference to some other brain tumours, *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* (Band 49(Suppl 137)), Seite 1-83
- [358] Saito, Y.; Sunamura, M.; Motoi, F.; Abe, H.; Egawa, S.; Duda, D. G., et al. (2006): Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region, *Cancer Gene Ther* (Band 13), Nr. 3, Seite 242-52
- [359] Arany, Z.; Huang, L. E.; Eckner, R.; Bhattacharya, S.; Jiang, C.; Goldberg, M. A., et al. (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 23, Seite 12969-73
- [360] Yoo, J. Y.; Kim, J. H.; Kwon, Y. G.; Kim, E. C.; Kim, N. K.; Choi, H. J., et al. (2007): VEGF-specific short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus elicits potent inhibition of angiogenesis and tumor growth, *Mol Ther* (Band 15), Nr. 2, Seite 295-302

- [361] Yu, D. C.; Chen, Y.; Dilley, J.; Li, Y.; Embry, M.; Zhang, H., et al. (2001): Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel, *Cancer Res* (Band 61), Nr. 2, Seite 517-25
- [362] Zeng, M.; Cerniglia, G. J.; Eck, S. L. und Stevens, C. W. (1997): High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation, *Hum Gene Ther* (Band 8), Nr. 9, Seite 1025-32
- [363] Jain, R. K. (2001): Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy, *Nat Med* (Band 7), Nr. 9, Seite 987-9
- [364] Willett, C. G.; Boucher, Y.; di Tomaso, E.; Duda, D. G.; Munn, L. L.; Tong, R. T., et al. (2004): Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer, *Nat Med* (Band 10), Nr. 2, Seite 145-7
- [365] Kabbinnavar, F.; Hurwitz, H. I.; Fehrenbacher, L.; Meropol, N. J.; Novotny, W. F.; Lieberman, G., et al. (2003): Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol* (Band 21), Nr. 1, Seite 60-5
- [366] Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W., et al. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med* (Band 350), Nr. 23, Seite 2335-42
- [367] Velcheti, V.; Viswanathan, A. und Govindan, R. (2006): The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey, *J Thorac Oncol* (Band 1), Nr. 5, Seite 501
- [368] Genentech USA, Inc. (2011): Possible Serious Side Effects and Additional Important Safety Information, bevacizumab, AVASTIN. <http://www.avastin.com/avastin/patient/>, Stand: 15.06.2011
- [369] Seoane, J.; Le, H. V.; Shen, L.; Anderson, S. A. und Massague, J. (2004): Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell* (Band 117), Nr. 2, Seite 211-23
- [370] Derynck, R. und Akhurst, R. J. (2007): Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease, *Nat Cell Biol* (Band 9), Nr. 9, Seite 1000-4
- [371] Friese, M. A.; Wischhusen, J.; Wick, W.; Weiler, M.; Eisele, G.; Steinle, A., et al. (2004): RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo, *Cancer Res* (Band 64), Nr. 20, Seite 7596-603
- [372] Seton-Rogers, S. E.; Lu, Y.; Hines, L. M.; Koundinya, M.; LaBaer, J.; Muthuswamy, S. K., et al. (2004): Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 5, Seite 1257-62
- [373] Forrester, E.; Chytil, A.; Bierie, B.; Aakre, M.; Gorska, A. E.; Sharif-Afshar, A. R., et al. (2005): Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis, *Cancer Res* (Band 65), Nr. 6, Seite 2296-302
- [374] Pardali, K. und Moustakas, A. (2007): Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer, *Biochim Biophys Acta* (Band 1775), Nr. 1, Seite 21-62
- [375] de Groot, R. P.; Kranenburg, O.; de Wit, L.; van den Eijnden-van Raaij, J.; Mummery, C.; van der Eb, A. J., et al. (1995): Adenovirus E1A antagonizes both negative and positive growth signals elicited by transforming growth factor beta 1, *Cell Growth Differ* (Band 6), Nr. 5, Seite 531-40
- [376] Kim, D. H.; Chang, J. H.; Lee, K. H.; Lee, H. Y. und Kim, S. J. (1997): Mechanism of E1A-induced transforming growth factor-beta (TGF-beta) resistance in mouse keratinocytes involves repression of TGF-beta type II receptor transcription, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 1, Seite 688-94
- [377] Missero, C.; Filvaroff, E. und Dotto, G. P. (1991): Induction of transforming growth factor beta 1 resistance by the E1A oncogene requires binding to a specific set of cellular proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 8, Seite 3489-93

- [378] Dole, V. S.; Smola, H.; Dooley, S.; Said, H. M.; Oldak, M.; Pfister, H. J., et al. (2009): The adenoviral E1A oncoprotein activates the Smad7 promoter: requirement of a functional E-box, *Int J Oncol* (Band 35), Nr. 6, Seite 1493-8
- [379] Pietenpol, J. A.; Stein, R. W.; Moran, E.; Yaciuk, P.; Schlegel, R.; Lyons, R. M., et al. (1990): TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains, *Cell* (Band 61), Nr. 5, Seite 777-85
- [380] Datto, M. B.; Hu, P. P.; Kowalik, T. F.; Yingling, J. und Wang, X. F. (1997): The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B, *Mol Cell Biol* (Band 17), Nr. 4, Seite 2030-7
- [381] Nishihara, A.; Hanai, J.; Imamura, T.; Miyazono, K. und Kawabata, M. (1999): E1A inhibits transforming growth factor-beta signaling through binding to Smad proteins, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 40, Seite 28716-23
- [382] Xu, L.; Chen, Y. G. und Massague, J. (2000): The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation, *Nat Cell Biol* (Band 2), Nr. 8, Seite 559-62
- [383] Shi, Y. und Massague, J. (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* (Band 113), Nr. 6, Seite 685-700
- [384] Gold, L. I. (1999): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer, *Crit Rev Oncog* (Band 10), Nr. 4, Seite 303-60
- [385] Pasche, B. (2001): Role of transforming growth factor beta in cancer, *J Cell Physiol* (Band 186), Nr. 2, Seite 153-68
- [386] Kjellman, C.; Olofsson, S. P.; Hansson, O.; Von Schantz, T.; Lindvall, M.; Nilsson, I., et al. (2000): Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma, *Int J Cancer* (Band 89), Nr. 3, Seite 251-8
- [387] Bodmer, S.; Strommer, K.; Frei, K.; Siepl, C.; de Tribolet, N.; Heid, I., et al. (1989): Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2, *J Immunol* (Band 143), Nr. 10, Seite 3222-9
- [388] Schneider, T.; Sailer, M.; Ansorge, S.; Firsching, R. und Reinhold, D. (2006): Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma, *J Neurooncol* (Band 79), Nr. 1, Seite 61-5
- [389] Siegel, P. M.; Shu, W.; Cardiff, R. D.; Muller, W. J. und Massague, J. (2003): Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 14, Seite 8430-5
- [390] Rifkin, D. B. (2005): Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 9, Seite 7409-12
- [391] Taipale, J. und Keski-Oja, J. (1997): Growth factors in the extracellular matrix, *FASEB J* (Band 11), Nr. 1, Seite 51-9
- [392] Bruna, A.; Darken, R. S.; Rojo, F.; Ocana, A.; Penuelas, S.; Arias, A., et al. (2007): High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene, *Cancer Cell* (Band 11), Nr. 2, Seite 147-60
- [393] Fakhrai, H.; Dorigo, O.; Shawler, D. L.; Lin, H.; Mercola, D.; Black, K. L., et al. (1996): Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 7, Seite 2909-14
- [394] Merzak, A.; McCrea, S.; Koocheckpour, S. und Pilkington, G. J. (1994): Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1, *Br J Cancer* (Band 70), Nr. 2, Seite 199-203
- [395] Nakano, A.; Tani, E.; Miyazaki, K.; Yamamoto, Y. und Furuyama, J. (1995): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas, *J Neurosurg* (Band 83), Nr. 2, Seite 298-307
- [396] Wrann, M.; Bodmer, S.; de Martin, R.; Siepl, C.; Hofer-Warbinek, R.; Frei, K., et al. (1987): T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta, *EMBO J* (Band 6), Nr. 6, Seite 1633-6

- [397] Kuppner, M. C.; Hamou, M. F.; Bodmer, S.; Fontana, A. und de Tribolet, N. (1988): The glioblastoma-derived T-cell suppressor factor/transforming growth factor beta 2 inhibits the generation of lymphokine-activated killer (LAK) cells, *Int J Cancer* (Band 42), Nr. 4, Seite 562-7
- [398] Fontana, A.; Frei, K.; Bodmer, S.; Hofer, E.; Schreier, M. H.; Palladino, M. A., Jr., et al. (1989): Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice, *J Immunol* (Band 143), Nr. 10, Seite 3230-4
- [399] Fontana, A.; Bodmer, S.; Frei, K.; Malipiero, U. und Siepl, C. (1991): Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: a role in resistance to immune rejection?, *Ciba Found Symp* (Band 157), Seite 232-8; discussion 238-41
- [400] Ishihara, H.; Kubota, H.; Lindberg, R. L.; Leppert, D.; Gloor, S. M.; Errede, M., et al. (2008): Endothelial cell barrier impairment induced by glioblastomas and transforming growth factor beta2 involves matrix metalloproteinases and tight junction proteins, *J Neuropathol Exp Neurol* (Band 67), Nr. 5, Seite 435-48
- [401] Massague, J. (2008): TGFbeta in Cancer, *Cell* (Band 134), Nr. 2, Seite 215-30
- [402] Stander, M.; Naumann, U.; Dumitrescu, L.; Heneka, M.; Loschmann, P.; Gulbins, E., et al. (1998): Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo, *Gene Ther* (Band 5), Nr. 9, Seite 1187-94
- [403] Leitlein, J.; Aulwurm, S.; Waltereit, R.; Naumann, U.; Wagenknecht, B.; Garten, W., et al. (2001): Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1,2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases, *J Immunol* (Band 166), Nr. 12, Seite 7238-43
- [404] Yingling, J. M.; Blanchard, K. L. und Sawyer, J. S. (2004): Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* (Band 3), Nr. 12, Seite 1011-22
- [405] ANTISENSE PHARMA, GmbH (2011): Informationen zur SAPPHIRE-Studie, Gehirntumoren, Klinische Studien bei. <http://www.anticancer.de/klinische-studien-bei-gehirntumoren/informationen-zur-sapphire-studie.html>, Regensburg <http://www.anticancer.de/klinische-studien-bei-gehirntumoren/informationen-zur-sapphire-studie.html>, Stand: 01.04.2011
- [406] Bogdahn, U.; Hau, P.; Stockhammer, G.; Venkataramana, N. K.; Mahapatra, A. K.; Suri, A., et al. (2011): Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study, *Neuro Oncol* (Band 13), Nr. 1, Seite 132-42
- [407] Schlingensiepen, K. H.; Schlingensiepen, R.; Steinbrecher, A.; Hau, P.; Bogdahn, U.; Fischer-Blass, B., et al. (2006): Targeted tumor therapy with the TGF-beta 2 antisense compound AP 12009, *Cytokine Growth Factor Rev* (Band 17), Nr. 1-2, Seite 129-39
- [408] Fakhrai, H.; Mantil, J. C.; Liu, L.; Nicholson, G. L.; Murphy-Satter, C. S.; Ruppert, J., et al. (2006): Phase I clinical trial of a TGF-beta antisense-modified tumor cell vaccine in patients with advanced glioma, *Cancer Gene Ther* (Band 13), Nr. 12, Seite 1052-60
- [409] Friess, H.; Yamanaka, Y.; Buchler, M.; Ebert, M.; Beger, H. G.; Gold, L. I., et al. (1993): Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival, *Gastroenterology* (Band 105), Nr. 6, Seite 1846-56
- [410] von Bernstorff, W.; Voss, M.; Freichel, S.; Schmid, A.; Vogel, I.; Johnk, C., et al. (2001): Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients, *Clin Cancer Res* (Band 7), Nr. 3 Suppl, Seite 925s-932s
- [411] Krasagakis, K.; Tholke, D.; Farthmann, B.; Eberle, J.; Mansmann, U. und Orfanos, C. E. (1998): Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma, *Br J Cancer* (Band 77), Nr. 9, Seite 1492-4
- [412] Reed, J. A.; McNutt, N. S.; Prieto, V. G. und Albino, A. P. (1994): Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression, *Am J Pathol* (Band 145), Nr. 1, Seite 97-104
- [413] Dunn, I. F.; Heese, O. und Black, P. M. (2000): Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs, *J Neurooncol* (Band 50), Nr. 1-2, Seite 121-37

- [414] Hjelmeland, M. D.; Hjelmeland, A. B.; Sathornsumetee, S.; Reese, E. D.; Herbstreith, M. H.; Laping, N. J., et al. (2004): SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility, *Mol Cancer Ther* (Band 3), Nr. 6, Seite 737-45
- [415] Platten, M.; Wick, W.; Wild-Bode, C.; Aulwurm, S.; Dichgans, J. und Weller, M. (2000): Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 268), Nr. 2, Seite 607-11
- [416] Uhl, M.; Aulwurm, S.; Wischhusen, J.; Weiler, M.; Ma, J. Y.; Almirez, R., et al. (2004): SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo, *Cancer Res* (Band 64), Nr. 21, Seite 7954-61
- [417] Brogi, E.; Wu, T.; Namiki, A. und Isner, J. M. (1994): Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only, *Circulation* (Band 90), Nr. 2, Seite 649-52
- [418] Detmar, M.; Yeo, K. T.; Nagy, J. A.; Van de Water, L.; Brown, L. F.; Berse, B., et al. (1995): Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells, *J Invest Dermatol* (Band 105), Nr. 1, Seite 44-50
- [419] Frank, S.; Hubner, G.; Breier, G.; Longaker, M. T.; Greenhalgh, D. G. und Werner, S. (1995): Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 21, Seite 12607-13
- [420] Pertovaara, L.; Kaipainen, A.; Mustonen, T.; Orpava, A.; Ferrara, N.; Saksela, O., et al. (1994): Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 9, Seite 6271-4
- [421] Breier, G.; Blum, S.; Peli, J.; Groot, M.; Wild, C.; Risau, W., et al. (2002): Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis, *Int J Cancer* (Band 97), Nr. 2, Seite 142-8
- [422] Nagineni, C. N.; Samuel, W.; Nagineni, S.; Pardhasaradhi, K.; Wiggert, B.; Detrick, B., et al. (2003): Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases, *J Cell Physiol* (Band 197), Nr. 3, Seite 453-62
- [423] Fuchshofer, R.; Stephan, D. A.; Russell, P. und Tamm, E. R. (2009): Gene expression profiling of TGFbeta2- and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling, *Exp Eye Res* (Band 88), Nr. 6, Seite 1020-32
- [424] Bian, Z. M.; Elnar, S. G. und Elnar, V. M. (2007): Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells, *Exp Eye Res* (Band 84), Nr. 5, Seite 812-22
- [425] Thompson, H. G.; Truong, D. T.; Griffith, C. K. und George, S. C. (2007): A three-dimensional in vitro model of angiogenesis in the airway mucosa, *Pulm Pharmacol Ther* (Band 20), Nr. 2, Seite 141-8
- [426] Vidro, E. K.; Gee, S.; Unda, R.; Ma, J. X. und Tsin, A. (2008): Glucose and TGFbeta2 modulate the viability of cultured human retinal pericytes and their VEGF release, *Curr Eye Res* (Band 33), Nr. 11, Seite 984-93
- [427] Ito, C.; Akimoto, T.; Ioka, T.; Kobayashi, T. und Kusano, E. (2009): TGF-beta inhibits vascular sprouting through TGF-beta type I receptor in the mouse embryonic aorta, *Tohoku J Exp Med* (Band 218), Nr. 1, Seite 63-71
- [428] Chakravarti, D.; Ogryzko, V.; Kao, H. Y.; Nash, A.; Chen, H.; Nakatani, Y., et al. (1999): A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity, *Cell* (Band 96), Nr. 3, Seite 393-403
- [429] Topper, J. N.; DiChiara, M. R.; Brown, J. D.; Williams, A. J.; Falb, D.; Collins, T., et al. (1998): CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 16, Seite 9506-11

- [430] Swope, D. L.; Mueller, C. L. und Chrivia, J. C. (1996): CREB-binding protein activates transcription through multiple domains, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 45, Seite 28138-45
- [431] Bevilacqua, M. A.; Faniello, M. C.; Quaresima, B.; Tiano, M. T.; Giuliano, P.; Feliciello, A., et al. (1997): A common mechanism underlying the E1A repression and the cAMP stimulation of the H ferritin transcription, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 33, Seite 20736-41
- [432] Yang, X. J.; Ogryzko, V. V.; Nishikawa, J.; Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996): A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A, *Nature* (Band 382), Nr. 6589, Seite 319-24
- [433] Fine, H. A.; Dear, K. B.; Loeffler, J. S.; Black, P. M. und Canellos, G. P. (1993): Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults, *Cancer* (Band 71), Nr. 8, Seite 2585-97
- [434] Stewart, L. A. (2002): Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials, *Lancet* (Band 359), Nr. 9311, Seite 1011-8
- [435] Gonzalez, J. und Gilbert, M. R. (2005): Treatment of astrocytomas, *Curr Opin Neurol* (Band 18), Nr. 6, Seite 632-8
- [436] Hau, P.; Jachimczak, P.; Schlingensiepen, R.; Schulmeyer, F.; Jauch, T.; Steinbrecher, A., et al. (2007): Inhibition of TGF-beta2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies, *Oligonucleotides* (Band 17), Nr. 2, Seite 201-12
- [437] Friedman, H. S.; Prados, M. D.; Wen, P. Y.; Mikkelsen, T.; Schiff, D.; Abrey, L. E., et al. (2009): Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma, *J Clin Oncol* (Band 27), Nr. 28, Seite 4733-40
- [438] Kreisl, T. N.; Kim, L.; Moore, K.; Duic, P.; Royce, C.; Stroud, I., et al. (2009): Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma, *J Clin Oncol* (Band 27), Nr. 5, Seite 740-5
- [439] Yu, Q. und Stamenkovic, I. (2004): Transforming growth factor-beta facilitates breast carcinoma metastasis by promoting tumor cell survival, *Clin Exp Metastasis* (Band 21), Nr. 3, Seite 235-42
- [440] Chorna, I.; Fedorenko, O.; Datsyuk, L. und Stoika, R. (2005): Expression of mRNA coding for TGF-beta and its receptors in irradiated human breast carcinoma MCF-7 cells differing in their sensitivity to doxorubicin, *Exp Oncol* (Band 27), Nr. 2, Seite 156-8
- [441] Serrero, G. und Lu, R. (2001): Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cells, *Antioxid Redox Signal* (Band 3), Nr. 6, Seite 969-79
- [442] Chakravarthy, D.; Green, A. R.; Green, V. L.; Kerin, M. J. und Speirs, V. (1999): Expression and secretion of TGF-beta isoforms and expression of TGF-beta-receptors I, II and III in normal and neoplastic human breast, *Int J Oncol* (Band 15), Nr. 1, Seite 187-94
- [443] Kouvidou, Ch; Latoufis, C.; Lianou, E.; Kouvatsas, G.; Kakouri, E.; Anagnostakis, D., et al. (2006): Expression of Smad4 and TGF-beta2 in colorectal carcinoma, *Anticancer Res* (Band 26), Nr. 4B, Seite 2901-7
- [444] Bellone, G.; Carbone, A.; Tibaudi, D.; Mauri, F.; Ferrero, I.; Smirne, C., et al. (2001): Differential expression of transforming growth factors-beta1, -beta2 and -beta3 in human colon carcinoma, *Eur J Cancer* (Band 37), Nr. 2, Seite 224-33
- [445] Hipfel, R.; Schitteck, B.; Bodingbauer, Y. und Garbe, C. (2000): Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization, *Br J Cancer* (Band 82), Nr. 6, Seite 1149-57
- [446] Konstantina, A.; Lazaris, A. C.; Ioannidis, E.; Liossi, A. und Aroni, K. (2011): Immunohistochemical expression of VEGF, HIF1-a, and PlGF in malignant melanomas and dysplastic nevi, *Melanoma Res* (Band 21), Nr. 5, Seite 389-94
- [447] Schitteck, B.; Psenner, K.; Sauer, B.; Meier, F.; Iftner, T. und Garbe, C. (2007): The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance, *Int J Cancer* (Band 120), Nr. 10, Seite 2110-8

- [448] Bristow, R. E.; Baldwin, R. L.; Yamada, S. D.; Korc, M. und Karlan, B. Y. (1999): Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma, *Cancer* (Band 85), Nr. 3, Seite 658-68
- [449] Gordinier, M. E.; Zhang, H. Z.; Patenia, R.; Levy, L. B.; Atkinson, E. N.; Nash, M. A., et al. (1999): Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 and 2 in ovarian carcinoma, *Clin Cancer Res* (Band 5), Nr. 9, Seite 2498-505
- [450] Do, T. V.; Kubba, L. A.; Du, H.; Sturgis, C. D. und Woodruff, T. K. (2008): Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition, *Mol Cancer Res* (Band 6), Nr. 5, Seite 695-705
- [451] Byrnes, A. P.; MacLaren, R. E. und Charlton, H. M. (1996): Immunological instability of persistent adenovirus vectors in the brain: peripheral exposure to vector leads to renewed inflammation, reduced gene expression, and demyelination, *J Neurosci* (Band 16), Nr. 9, Seite 3045-55
- [452] Byrnes, A. P.; Wood, M. J. und Charlton, H. M. (1996): Role of T cells in inflammation caused by adenovirus vectors in the brain, *Gene Ther* (Band 3), Nr. 7, Seite 644-51

8 Anhang

Tab. 15: Microarray-Analyse differenziell exprimierter E2F-Targetgene in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Ad5-Ad312			Ad5-Delo3RGD			Ad5-wildtyp			Gen
	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	
BTG3					3,37		2,93	2,64		<i>BTG family, member 3</i>
BUB1					-13,00			-2,46	-2,14	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog</i>
BUB1B		2,64	-2,83			-2,14	-2,46	-3,48	-2,83	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta</i>
CALR				4,92	2,39	3,29	5,66	3,53	2,84	<i>calreticulin</i>
CCNA2								-3,29	-2,55	<i>cyclin A2</i>
CDC2								-3,13	-2,25	<i>cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M</i>
CDC20					-3,03		-2,83	-2,46	-3,25	<i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>
CDC45L					2,46			3,73	2,14	<i>CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)</i>
CDKN1B								-4,59	-3,25	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
CENPA				-3,25	-3,25	-2,83	-4,92	-4,92	-4,92	<i>centromere protein A</i>
DHFR				2,83	2,61	2,70	2,14	2,64	2,30	<i>dihydrofolate reductase</i>
EIF2AK2					2,46	2,14		2,83		<i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>

HMGB3		-3,03	-2,30	-2,14		-3,03	-3,03	<i>high-mobility group box 3</i>
ID3			-4,59			-3,03	-4,29	<i>inhibitor of DNA binding 3</i>
KPNA2						-2,47	-2,14	<i>karyopherin alpha 2</i>
MYC		-3,25	-3,25	-8,57				<i>v-myc myelocytomatosis</i>
PA2G4			3,25		2,14	3,23	2,14	<i>proliferation-associated 2G4</i>
RAD51AP1	-2,30	-3,25		-3,25		-2,83		<i>RAD51 associated protein 1</i>
RPA2			2,14		2,14	2,14		<i>replication protein A2</i>
RRM2		2,14	2,64	2,30	2,30	3,48	2,30	<i>ribonucleotide reductase M2</i>
STAM		-2,14	-2,14	-2,46		-3,73		<i>signal transducing adaptor molecule</i>
TEAD4					2,83	4,00	2,64	<i>TEA domain family member 4</i>
TOP2A					-2,83	-4,16	-2,47	<i>topoisomerase (DNA) II alpha</i>

Tab. 16: Microarray-Analyse differenziell exprimierter Apoptose-assoziierten Gene in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Ad5-Ad312			Ad5-Delo3RGD			Ad5-wildtyp			Gen
	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	
AKT3				3,03	2,14		2,46	2,46		<i>v-akt murine thymoma</i>
APAF1	-2,30	-2,46		-3,25	-2,14	-2,64	-4,59	-59,71		<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
BCL2L1					-2,30	-3,30			-2,56	<i>BCL2-like 1</i>
BCL2L11					3,73		3,25	4,29		<i>BCL2-like 11</i>
BID					2,38	2,30		4,64	2,46	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BNIP3L				-9,85	-3,48	-3,73	-11,31	-22,63	-3,73	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like</i>
CD40						2,30		3,48	3,03	<i>CD40 molecule</i>
DFFA						2,46	2,83	3,25	3,03	<i>DNA fragmentation factor, alpha polypeptide</i>
FADD				-3,03		-3,48	-2,14	-2,83	-2,83	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
JUN						-3,81	-2,14	-5,48	-2,65	<i>jun oncogene</i>
MAP2K4							-2,46	-3,73	-2,38	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MCL1				-2,64		-2,64	-2,83	-2,47	-2,60	<i>myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)</i>
MYC				-3,25	-3,25	-8,57				<i>v-myc myelocytomatosis</i>
NFKBIA				-4,00	-2,64	-2,64	-3,73			<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>

							<i>inhibitor, alpha</i>
NR3C1		-2,35	-2,49	-2,43	-2,88	-2,39	<i>nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>
PIK3CD		-2,46	-2,83		-2,30		<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>
PIK3R1			-2,14		-3,96	-2,64	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
PRKAR1B		8,00			5,28	5,66	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta</i>
TNFRSF1A		-4,29	-3,03	-4,29	-4,59	-2,30	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>
TP53			-4,29	2,14		2,46	<i>tumor protein p53</i>
TP73				34,30	55,72		<i>tumor protein p73</i>
IL1RAP					-3,48	-3,73	<i>interleukin 1 receptor accessory protein</i>
IRF2					-3,03	-2,46	<i>interferon regulatory factor 2</i>
MAP2K5		19,70	2,64				<i>mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
NGFB	8,57	2,14					<i>nerve growth factor (beta polypeptide)</i>
PARP1			2,14	2,30			<i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
SFRS2IP				-2,14	-2,73		<i>splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein</i>
TRAF3				2,46	2,14		<i>TNF receptor-associated factor 3</i>

Tab. 17: Microarray-Analyse differenziell exprimierter Gene des Wnt-Signalweg in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Ad5-Ad312			Ad5-Delo3RGD			Ad5-wildtyp			Gen
	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	
CACYBP					2,83	2,14				<i>calcyclin binding protein</i>
CCND1				-3,25	-5,66	-3,28	-2,46	-2,83		<i>cyclin D1</i>
CCND3							2,64	2,64		<i>cyclin D3</i>
CD44				-2,30	-3,43	-4,29	-2,14	-2,64		<i>CD44 molecule</i>
DAAM1					-2,14	-3,73		-5,28		<i>dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>
DKK1				-18,38	-3,48	-8,00	-4,59	-2,46	-3,73	<i>dickkopf homolog 1</i>
FZD2				-8,57	-6,96	-17,15	-6,50	-4,92	-2,30	<i>frizzled homolog 2</i>
FZD5					-2,30	-2,83		-3,03	-3,03	<i>frizzled homolog 5</i>
FZD7				-2,94			-2,93	-2,81		<i>frizzled homolog 7</i>
IL8					-3,32	-4,46	21,11	-3,56	-2,86	<i>interleukin 8</i>
JUN						-3,81	-2,14	-5,48	-2,65	<i>jun oncogene</i>
LDLR					-5,08	-2,64	-2,64	-3,69		<i>low density lipoprotein receptor</i>
LRP1				2,64	2,30					<i>low density lipoprotein-related protein 1</i>
NDP				-14,93	-17,15	-13,00	-11,31	-4,92	-6,06	<i>Norrie disease</i>
MYC				-3,25	-3,25	-8,57				<i>v-myc myelocytomatosis</i>
PAFAH1B1				-2,30	-2,30	-2,73	-2,59	-3,49	-2,83	<i>platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, subunit 1 (45kDa)</i>

PLAU		-5,89	-22,98	-2,30	-2,83	-6,08	<i>plasminogen activator</i>
RAC3	-21,11	-2,83	-25,99	3,25			<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 3</i>
SFRP1		-8,11	-3,92		-4,35	-3,61	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
SMAD3		-6,11	-33,05	-5,35	-5,91	-5,89	<i>SMAD family member 3</i>
TBL1X			2,94		-2,14	-2,14	<i>transducin (beta)-like 1X-linked</i>
TBL1XR1		-4,59	-2,30		-4,29	-6,50	<i>transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1</i>
TCF7		8,00			6,15	2,46	<i>transcription factor 7</i>
VANGL1			-2,63			-3,48	<i>vang-like 1</i>
VEGFA		-3,98		-2,64	-2,59	-3,48	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFC		-2,46	-2,30	-4,00		-3,48	<i>vascular endothelial growth factor C</i>
WNT5A		-4,04	-4,94	-3,61		-6,06	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>
WNT5B	2,14	-4,59			-4,00	-3,03	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5B</i>

Tab. 18: *Microarray*-Analyse differenziell exprimierter Gene des TGF- β -Signalweg in Gliomzelllinien nach adenoviraler Transduktion, dargestellt sind die *Fold Change*-Werte

Symbol	Ad5-Ad312			Ad5-Delo3RGD			Ad5-wildtyp			Gen
	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	LN-18	U-373 MG	U-87 MG	
ACVR1								-2,64	-2,4	<i>activin A receptor, type I</i>
ACVR2B				2,46			2,64		6,50	<i>activin A receptor, type IIB</i>
BMP6				7,46	3,48		5,28	2,83	2,46	<i>bone morphogenetic protein 6</i>
BMP8B					3,48		32,00		8,57	<i>bone morphogenetic protein 8b</i>
DAB2						-2,86	-2,64	-2,64	-2,36	<i>disabled homolog 2</i>
E2F5	3,73			4,92		4,00	4,29			<i>E2F transcription factor 5</i>
EP300						-2,46		-2,30	-2,30	<i>E1A binding protein p300</i>
FKBP1A				2,14		2,14		2,30		<i>FK506 binding protein 1A</i>
FST				-6,96		-15,61	-4,90	-2,30	-3,25	<i>folistatin</i>
ID3					-4,59	-4,29		-3,03		<i>inhibitor of DNA binding 3</i>
JUN						-3,81	-2,14	-5,48	-2,65	<i>jun oncogene</i>
LTBP1				-2,83		-3,48	-2,46	-2,30	-2,14	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>
MYC				-3,25	-3,25	-8,57				<i>v-myc myelocytomatosis</i>
SERPINE1				-5,11	-3,03	-2,83	-2,46			<i>serpin peptidase inhibitor</i>
SMAD3				-6,11	-33,05	-5,35	-5,91	-5,89		<i>SMAD family member 3</i>
TGFB2				-7,2	-5,0	-2,83	-5,5	-2,6		<i>transforming growth factor, beta 2</i>

TGFBR2			-3,25	-2,46	-4,00	-2,65	<i>transforming growth factor, beta receptor II</i>
TGIF1	-2,30		-4,59	-2,30	-3,73	-3,48	<i>TGFB-induced factor homeobox 1</i>
THBS1	-2,73	-10,58			-7,87		<i>thrombospondin 1</i>
ZFYVE9 (SARA)	3,48	2,46		3,25			<i>zinc finger, FYVE domain containing 9 (SARA: SMAD anchor for receptor activation)</i>

Tab. 19: 3'-UTR microRNA Bindemotiv-Analyse von differenziell regulierten Genen durch Ad5-Delo3RGD und Ad5-wt in Gliomzellen

3'-UTR miRNA Bindemotiv	miRNA	Anzahl differenziell exprimierter miRNA- Targetgene ¹			Gensymbole der differenziell exprimierten Targetgene ³
		Ad5- Delo3RGD	Ad5- wildtyp	Ad5-Delo3RGD und Ad5-wildtyp ²	
GCACTTT	MIR-17-5P, MIR-20A, MIR-106A, MIR-106B, MIR-20B, MIR-519D	25	27	12	C17orf39, PAFAH1B1, ZNF238, RRM2, BHLHB3, KCNMA1, PTPRO, STC1, QKI, APP, DAZAP2, ARL4C
TGTTTAC	MIR-30A-5P, MIR-30C, MIR-30D, MIR-30B, MIR-30E-5P	19	28	12	BNIP3L, C10orf56, AHNAK, PHF15, ITSN1, NRIP1, NRP1, STC1, QKI, IRS1, ARID5B, RASA1
GTGCCTT	MIR-506	19	23	10	PAFAH1B1, CTDSP2, C10orf56, ATP2B4, ZFP36L1, MAPKAPK2, NRP1, QKI, ARID5B, SOCS5
ACCAAAG	MIR-9	17	16	8	ASXL1, KCNMA1, MAPKAPK2, STC1, QKI, RNF24, SOCS5, ARL4C
TGAATGT	MIR-181A, MIR-181B, MIR-181C, MIR-181D	16	21	10	C17orf39, C6orf62, ZFP36L1, PHF15, PHLDA1, KCNMA1, KLF6, STC1, QKI, DAZAP2
TGCTGCT	MIR-15A, MIR-16, MIR-15B, MIR-195, MIR-424, MIR-497	15	17	6	PAFAH1B1, PHF15, BHLHB3, PHF20, QKI, APP
TGCCTTA	MIR-124A	15	19	5	C10orf56, AHNAK, STC1, QKI, PH-4
TTTGAC	MIR-19A, MIR-19B	12	28	8	BTG1, ZNF238, BCL3, ITSN1, PHF20, QKI, TNPO2, SOCS5

ACTGTGA	MIR-27A, MIR-27B	14	25	8	CTDSP2, C10orf56, ZFP36L1, BCL3, NRIP1, PLK2, QKI, IRS1
CAGTATT	MIR-200B, MIR-200C, MIR-429	14	23	8	C6orf62, C10orf56, CITED2, BHLHB3, ASXL1, NRIP1, PLK2, QKI
GTGCAAT	MIR-25, MIR-32, MIR-92, MIR-363, MIR-367	9	21	8	TRIO, C17orf39, C6orf62, CREB3L2, PAFAH1B1, RGS3, PTPRO, SOCS5
ATGTACA	MIR-493	7	21	4	BTG1, CITED2, BHLHB3, KCNMA1
CTTTGTA	MIR-524	13	20	4	PHF15, SORBS2, QKI, NR2F2
TGCACTT	MIR-519C, MIR-519B, MIR-519A	13	19	7	PAFAH1B1, ZNF238, BHLHB3, ARHGAP29, STC1, QKI, DAZAP2
CTATGCA	MIR-153	6	18	6	SH3BP4, QKI, APP, CITED2, RASA1, ASXL1
TTGCACT	MIR-130A, MIR-301, MIR-130B	12	17	8	PAFAH1B1, BTG1, ZNF238, BHLHB3, NRP1, STC1, QKI, SOCS5
AATGTGA	MIR-23A, MIR-23B	8	17	4	BNIP3L, MARCKSL1, ZNF238, QKI
TTTGTAG	MIR-520D	9	16	6	QKI, PHF15, SOCS5, CITED2, BHLHB3, KCNMA1
TTGCCAA	MIR-182	13	16	8	PAFAH1B1, SH3BP4, QKI, ZFP36L1, CITED2, DAZAP2, BHLHB3, RASA1
CACTGTG	MIR-128A, MIR-128B	10	16	6	PLK2, CTDSP2, IRS1, ZFP36L1, CITED2, DAZAP2
TGTGTGA	MIR-377	7	15	5	NRG1, QKI, ZFP36L1, RASA1, KCNMA1
TGCACTG	MIR-148A, MIR-152, MIR-148B	9	15	5	C6orf62, NRP1, ZNF238, PRKAG2, QKI

GTACTGT	MIR-101	6	15	5	STC1, QKI, APP, SOCS5, PHLDA1
CAGTGTT	MIR-141, MIR-200A	12	15	8	NRP1, RBM7, ZNF238, C10orf56, QKI, TNS3, ITSN1, ASXL1
ACATTCC	MIR-1, MIR-206	13	15	8	SYNJ2, NRP1, PAFAH1B1, QKI, ZFP36L1, TNPO2, CITED2, RASA1

⁽¹⁾ Differenziell exprimierte Gene waren mindestens um den Faktor 2 im Vergleich von adenoviral transduzierten zu unbehandelten Zellen reguliert, d.h. der *Fold Change* war ≥ 2 bzw. ≤ -2 .

⁽²⁾ Die Anzahl der Gene, die nach der Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD differenziell exprimierten wurden.

⁽³⁾ Die Gene, die nach der Transduktion mit Ad5-wt und Ad5-Delo3RGD differenziell exprimierten wurden.

9 Glossar

A.dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Ad5	Adenovirus Subtyp 5, Serogruppe C
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CMV	Cytomegalovirus
CPE	zytopathischer Effekt, <i>cytopathic effect</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig, <i>double stranded</i>

DTT	DL-Dithiothreitol (1,4 – Dithiol 2,3 –dihydroxybutan)
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FKS	fötales Kälberserum
<i>Fold Change</i>	x-fache Änderung
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
hpi	Stunden nach Infektion, <i>hours post infection</i>
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
<i>in vitro</i>	im Modellsystem
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
ITR	Inverted Terminal Repeat
k	Kilo
kb	Kilobasen
L	Liter
M	Molar
min	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Million
MOI	Multiplizität der Infektion, <i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger RNA</i>
n	nano (10^{-9})
nm	Nanometer

nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung, <i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro minute, <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMAD	Wortschöpfung aus: Drosophila-Protein „MAD“ (<i>mothers against decapentaplegic</i>) und dem SMA (<i>smaller worms</i>)-Gen aus Caenorhabditis
SRB	Sulforhodamin B
ss	einzelsträngig, <i>single stranded</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor, <i>Transforming Growth Factor β</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Tween® 20	Polyoxyethylensorbitammonolaurat

U	Einheit der Enzymaktivität, Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	volume to volume
w/v	weight to volume
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
Δ	delta (Deletion)
μ	mikro (10^{-6})

Danksagung

Ein aufrichtiges Dankeschön an alle Menschen,

die mich persönlich und fachlich in den letzten Jahren, auf den Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben!

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Hermann Lage bedanken. Er gab mir die Möglichkeit mich selbst zu verwirklichen. Indem ich die zwei Dinge, die mir am meisten bedeuten, tun dürfte - wissenschaftlich Forschen und dennoch genug Zeit für meine Familie, insbesondere meine Kinder, haben.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Pathologie“ für die freundliche Aufnahme, das herzliche Miteinander und die Laborunterstützung danken. Vielen Dank an Barbara Meyer-Bartell, Manuela Pacyna-Gengelbach, Alaa Derwysch und insbesondere Birgit Schaefer für den fachlichen Beistand. Ein herzlichstes Dankeschön an Dr. Alexandra Stege und Andrea Krühn, die für mich während der gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe zu Freunden geworden sind.

Vielen Dank auch an unsere ehemaligen Biologielaboranten-Lehrlinge und die vielen netten Gespräche und Scherze: Paul Jank, Tina Reiche, Diana Tiesel, Eileen Benke.

Ferner möchte ich mich bei PD Dr. Per Sonne Holm, Klaus Mantwill und Regina Holzmüller vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, für die Bereitstellung der Viren und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Neben Alexandra und Andrea möchte ich auch den restlichen Mitgliedern unseres Mensa-Clubs meinen Dank für die vielen, teils leckeren, aber auf jeden Fall unterhaltsamen Mittagessen aussprechen: Dr. Jan Budczies, sowie Dr. Markus Möbs und meiner Freundin Dr. Annika Lehmann.

Für die fachliche Beratung in medizinischen Fragen möchte ich PD Dr. med. Arend Koch und Dr. med. Barbara Ingold Heppner danken. Für die vielen, vielen konstruktiven Tipps und die Aufbauarbeit ein ganz herzliches Dankeschön an Ute Kruse-Boitschenko!!

Mein größter Dank gilt meiner Familie.

Insbesondere meiner Mutter möchte ich neben den Babysitter-Dienst v.a. für die moralische Unterstützung danken!!! Und dafür, dass sie immer für mich da war. Vielen Dank auch an Lutz, für die Unterstützung, aber vor allem, dass er meinen Kindern der tollste Opa ist und natürlich für die sonntäglichen Frühstücke.

Mein inniger Dank gilt meinem Mann Constantin. Auch wenn er nicht immer persönlich anwesend war, möchte ich ihn für die passenden, aufbauenden Worte aus der Ferne danken. Und es tut mir leid, dass mir offensichtlich das Talent dafür fehlt.

Alles was ich erreicht und geschafft habe, würde mir jedoch nicht so viel bedeuten, wenn ich nicht meine beiden Mädels hätte. Mama hat euch beide ganz doll lieb: „Ewig wie's die Sterne gibt, glaub' daran wirst du geliebt.“

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird im Internet nicht veröffentlicht.

Publikationen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften.

Kurucz R, Belian E, **Treue D**, Lage H: Regulation of mRNA Expression in Drug-sensitive and Drug-resistant Gastric Carcinoma cells is independent of YB-1 Expression. Anticancer Res. 2010 Feb;30(2):693-8.

Belian E, Kurucz R, **Treue D**, Lage H: Effect of YB-1 on the Regulation of Micro RNA Expression in Drug-sensitive and Drug-resistant Gastric Carcinoma Cells. Anticancer Res. 2010 Feb;30(2):629-33.

Holzmüller R, Mantwill K, Gauschon A, Kasajima A, **Treue D**, Weichert W, Lage H, Schuster T, Schlegel J and Holm PS: YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma. International Journal of Cancer 2010 Nov 17.

Kongressbeiträge

Pfüller CF, **Vogler D**, Bendix I, Prozorovski T, Ullrich O, Zipp F, Waiczies S (2006): Diplom HMG-CoA reductase inhibitors induce regulatory T cells. 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, Paris

Treue D, Budczies J, Mantwill K, Holm PS, Lage H (2009): Cellular pathways triggered by “oncolytic” adenoviruses in glioma. 15th International AEK cancer congress, Berlin, Book of Abstracts p.116.

Treue D, Budczies J, Mantwill K, Holm PS, Lage H (2010): Triggering of TGF- β - and Wnt- signalling pathways by “oncolytic” adenoviruses in glioma. AACR 101st Annual Meeting 2010, Washington D.C.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Berlin, den

.....

Denise Treue